

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Karolína Těšíková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STANOVENÍ MASTNÝCH KYSELIN VE VYBRANÉM TYPU
SÝRA**

ASSESSMENT OF FATTY ACIDS IN SELECTED TYPE OF CHEESE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Karolína Těšíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1121/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Karolína Těšíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Stanovení mastných kyselin ve vybraném typu sýra

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - sýry s vysokodohřívanou sýřeninou – charakteristika, složení, vlastnosti, technologie výroby
 - lipidy – charakteristika, rozdělení, vlastnosti; lipidy v sýrech
 - mastné kyseliny – charakteristika, rozdělení, vlastnosti; mastné kyseliny v sýrech
 - možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech – princip, provedení
2. Pomocí metody GC–FID identifikujte a kvantifikujte mastné kyseliny ve vzorcích sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou
3. Porovnejte obsah mastných kyselin v jednotlivých vzorcích

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Karolína Těšíková
student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací a kvantifikací volných a vázaných mastných kyselin v modelových sýrech typu Moravský bochník, vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

Teoretická část se zabývá charakteristikou lipidů a mastných kyselin. Dále je zde rozebráno rozdělení sýrů, popis výroby a jejich složení. Na závěr je popsána plynová chromatografie jako nejčastěji používaná metoda pro stanovení mastných kyselin.

V experimentální části byl porovnán obsah volných a vázaných mastných kyselin ve čtyřech modelových vzorcích sýrů v závislosti na použitých sýrařských kulturách. Pro extrakci lipidů ze vzorků sýrů byla zvolena metoda podle ČSN EN ISO 1735:2005. Přítomné mastné kyseliny byly identifikovány a kvantifikovány pomocí plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí po převedení na methylestery kyselou esterifikací methanolickým roztokem bortrifluoridu jako katalyzátorem.

Celkem bylo ve vzorcích sýra identifikováno 32 vázaných a 20 volných mastných kyselin.

ABSTRACT

This bachelor's thesis is focused on identification and quantification of free and bound fatty acids in model cheeses of „Moravský bochník“, made at Tomáš Baťa University in Zlín.

Theoretical part is dealing with characteristics of lipids and fatty acids. Furthermore, the classification of cheese types and description of their production and composition are discussed. Finally, the gas chromatography is described as a most commonly used method for assessment of fatty acids.

The experimental part focuses on comparing the content of free and bound fatty acids in four model cheeses in relation to the use of different microbial cultures. The method according to the ČSN EN ISO 1735:2005 was employed for extraction of lipids from cheese samples. The present fatty acids were identified and quantified by gas chromatography with flame ionization detector after conversion to methylesters using acid-catalysed esterification with a methanolic solution of boron trifluoride.

In total, 32 bound and 20 free fatty acids were identified in cheese samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýr, lipidy, mastné kyseliny, GC

KEY WORDS

cheese, lipids, fatty acids, GC

CITACE

TĚŠÍKOVÁ, K. *Stanovení mastných kyselin ve vybraném typu sýra*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat paní Ing. Evě Vítové, Phd. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala v průběhu psaní této práce. V neposlední řadě chci poděkovat přátelům a rodině, která mě podporuje po celé studium.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Lipidy	8
2.2	Rozdělení lipidů.....	8
2.2.1	Jednoduché lipidy	8
2.2.2	Složené lipidy	9
2.2.3	Komplexní lipidy	9
2.2.4	Doprovodné látky lipidů	10
2.3	Mastné kyseliny	10
2.3.1	Klasifikace mastných kyselin.....	10
2.3.2	Nasycené mastné kyseliny	10
2.3.3	Nenasycené mastné kyseliny s jednou a více dvojnými vazbami	11
2.3.4	Esenciální a neesenciální mastné kyseliny	11
2.4	Charakteristika sýrů	11
2.4.1	Obecný princip výroby sýrů.....	11
2.4.2	Rozdělení sýrů	12
2.4.3	Přírodní sýry	13
2.5	Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou	13
2.5.1	Historie Moravského bochníku	14
2.5.2	Výroba sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou.....	14
2.5.3	Složení sýrů	15
2.5.4	Kultury používané při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou	17
2.6	Stanovení mastných kyselin v sýrech pomocí plynové chromatografie	18
2.6.1	Princip plynové chromatografie	18
2.6.2	Instrumentace plynového chromatografu	19
3	Experimentální část.....	22
3.1	Chemikálie a laboratorní vybavení	22
3.1.1	Chemikálie pro extrakci lipidů.....	22
3.1.2	Chemikálie pro kyselou esterifikaci	22
3.1.3	Chemikálie pro stanovení mastných kyselin	22
3.1.4	Laboratorní přístroje	22
3.1.5	Laboratorní pomůcky.....	22

3.1.6	Plyny pro plynový chromatograf.....	23
3.2	Analyzované vzorky	23
3.2.1	Použité mikrobiální kultury	23
3.3	Použité metody a pracovní postupy.....	24
3.3.1	Extrakce lipidů ze vzorku sýra (ČSN EN ISO 1735:2005).....	24
3.3.2	Kyselá esterifikace pomocí methanolického roztoku bortrifloridu (metoda pro TAG)	25
3.3.3	Kyselá esterifikace pomocí methanolického roztoku bortrifloridu (metoda pro VMK)	26
3.4	Stanovení methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID	26
3.4.1	Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin.....	26
3.4.2	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin.....	27
3.5	Statistické vyhodnocení výsledků	28
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Standardy methylesterů mastných kyselin	30
4.2	Identifikace a kvantifikace vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýrů	31
4.3	Identifikace a kvantifikace volných mastných kyselin ve vzorcích sýrů.....	34
4.4	Srovnání obsahu těkavých, nasycených a nenasycených mastných kyselin ve vzorcích sýrů	37
5	Závěr	42
6	Seznam použité literatury	44
7	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	48
8	Seznam příloh	49
9	Přílohy	50

1 ÚVOD

Sýry jsou součástí lidské stravy již odnepaměti. Počátky jejich vzniku se datují od doby před 10 000 lety, kdy lidé začali domestikovat zvířata produkující mléko. Existuje několik teorií o jejich vzniku. Některé prameny říkají, že sýr vznikl následkem působení žaludečních enzymů při skladování v nádobách vyrobených ze žaludků přežvýkavců. I když v dnešní době považujeme sýr za běžnou potravinu, v dobách Římské říše byla výroba sýrů cenným řemeslem nejen na území Evropy, ale i na Středním východě. V současnosti existuje na trhu více než 300 druhů sýru, kde každý sýr má jedinečnou konzistenci, chuť a aroma.

Výroba sýrů je proces skládající se ze standardizace mléka, jeho pasterizace a srážení, dále z drobení a zahřívání zrna, formování, lisování, solení a zrání sýrové hmoty.

Pro sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (např. Ementál, Moravský bochník) je charakteristické dohřívání zrna při 50-55 °C s použitím speciálních sýrařských kultur.

Z výživového hlediska je sýr výborným zdrojem živočišných tuků. Tuky jsou důležitou součástí buněk. Řadí se mezi lipidy, tj. do skupin látek nerozpustných ve vodě. Jsou zdrojem a rezervou energie a zprostředkovávají strukturní a ochrannou funkci. Tuk je v mléce rozptýlen v podobě kapének obsahujících fosfolipidy, glykoproteiny, enzymy, cholesterol a triacylglyceroly.

Základní složkou molekuly tuku jsou alifatické monokarboxylové kyseliny známé jako mastné kyseliny. V sýru je z mastných kyselin nejvíce obsažena kyselina palmitová, myristová, stearová a olejová.

Cílem této práce je stanovení volných a vázaných mastných kyselin ve vybraných vzorcích sýru Moravský bochník, vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, v závislosti na množství přidaných kultur bakterií rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Pro stanovení mastných kyselin byla použita plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Lipidy tvoří hlavní složku potravy člověka a jsou nezbytné pro správnou funkci organismu. Definujeme je jako přírodní sloučeniny obsahující esterově vázané mastné kyseliny (MK) a alkohol (např. glycerol, cholesterol). Hlavní vlastností lipidů je hydrofóbnost a dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech (např. ether, chloroform a benzen). Lipidy tvoří podstatnou část potravin, protože obsahují esenciální mastné kyseliny a mají vysokou energetickou hodnotu [1, 2].

2.2 Rozdělení lipidů

Lipidy rozdělujeme na jednoduché, složené, komplexní lipidy a doprovodné látky lipidů. Jednoduché lipidy neboli homolipidy jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů. Jsou to acylglyceroly a vosky. Složené lipidy (heterolipidy) představují sloučeniny mastných kyselin a alkoholů, obsahující navíc kovalentně navázané další sloučeniny, např. kyselinu fosforečnou. Do této kategorie patří fosfolipidy a glykolipidy. Za komplexní lipidy považujeme homolipidy i heterolipidy vázané různými fyzikálními vazbami, např. vodíkovými. Do této skupiny řadíme lipoproteiny. Mezi doprovodné látky lipidů patří steroidy, karotenoidy a lipofilní vitaminy [1–3].

Další rozdělení lipidů, které se užívá spíše z praktického důvodu, je na neutrální a polární lipidy. K neutrálním lipidům řadíme estery glycerolu, steroidy a jejich estery a volné mastné kyseliny (VMK). Za polární lipidy považujeme například fosfolipidy. Tento systém klasifikace je užíván zejména při chromatografickém dělení [1].

2.2.1 Jednoduché lipidy

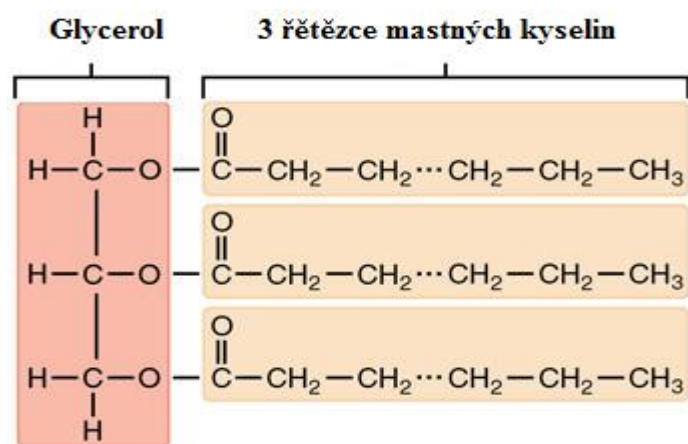
Molekuly jednoduchých lipidů jsou neutrální a nepolární. Jsou to estery mastných kyselin s alkoholy. Nejčastěji se setkáme v této skupině s vosky a triacylglyceroly (TAG). Vyskytují se zde i ethery glycerolu nebo hemiacetály vyšších alifatických aldehydů, glykoly atd. [1, 3].

2.2.1.1 *Triacylglyceroly*

Triacylglyceroly neboli estery glycerolu patří mezi potravinářsky nejvýznamnější lipidy. Tvoří základ živočišných tuků a rostlinných olejů. Tuky a oleje od sebe rozlišujeme na základě jejich kapalného stavu. Oleje jsou za normální pokojové teploty kapalné, kdežto tuky jsou pevné a pro dosažení kapalného stavu je třeba zvýšit teplotu. Avšak hranice mezi oleji a tuky není přesně definována a toto označení se používá většinou jako orientační. Konzistence TAG je závislá na poměru mastných kyselin obsahujících jednoduché, či násobné vazby. S růstem obsahu mastných kyselin s jednoduchou vazbou roste i tuhost tuku a naopak [1, 4].

Z chemického hlediska jsou TAG látky, které obsahují tři mastné kyseliny esterově vázané na molekule glycerolu. Tuto strukturu ukazuje Obr. 1. Tyto mastné kyseliny mohou být buď stejné (jednoduché TAG), nebo odlišné (složené TAG) [1].

Kromě TAG existují i monoacylglyceroly obsahující pouze jednu vázanou MK a diacylglyceroly se dvěma vázanými MK [1].



Obr. 1: Struktura triacylglycerolu [5]

2.2.1.1 Vosky

Vosky jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Mají hydrofobní charakter a plní většinou ochranou a izolační funkci. Příkladem vosků je včelí vosk a lanolín [4, 6].

2.2.2 Složené lipidy

Složené lipidy mají podstatně složitější chemickou strukturu než lipidy jednoduché. Jejich společným znakem je amfifilní charakter, resp. obsahují hydrofóbní i hydrofilní část. Jsou tvořeny MK, alkoholem a polární složkou, kterou bývá kyselina fosforečná, sacharid, či dusíkatá sloučenina. Podle obsahu polární složky se heterolipidy dělí na fosfolipidy a glykolipidy [4, 6].

Polární složkou fosfolipidů je kyselina fosforečná, na kterou se váže další prvek nejčastěji dusíkatá báze. Fosfolipidy jsou základem dvojvrstvy biomembrán a podle alkoholu se dělí na glycerofosfolipidy (glycerol) a sfingofosfolipidy (sfingosin). Glykolipidy obsahují jako polární složku určitý sacharid a jsou nejčastěji tvořeny alkoholem sfingosinem (sfingoglykolipidy). Nacházejí se v cytoplazmatické membráně živočichů a jejich sacharidová část zajišťuje přítomnost antigenních determinantů, nebo zachycení virových částic. Do skupiny glykolipidů patří cerebrosidy, gangliosidy a sulfatidy [4, 6].

2.2.3 Komplexní lipidy

Nejznámějšími komplexními lipidy jsou lipoproteiny. Lipoproteiny vznikají hydrofobní interakcí nepolárních složek lipidů a bílkovin (apolipoproteiny). Lipidovou složku mohou tvořit triacylglyceroly, nebo estery cholesterolu. V lipidové části jsou také přítomny lipidy s polární složkou, konkrétně lecithiny a sfingomyeliny. Jejich úkolem je propojení nepolárních lipidů s proteinovým podílem. Lipoproteiny se nacházejí v buněčných membránách, v cytoplasmě buněk, v krevní plasmě a ve vaječném žloutku. Nejlépe

prozkoumaný lipoprotein je plazmový lipoprotein, protože stojí za vznikem řady chorob spojených s krevním oběhem [1, 7].

2.2.4 Doprovodné látky lipidů

Doprovodné lipidy neboli lipoidy zahrnují do své skupiny nejen steroidy, karotenoidy a lipofilní vitamíny, ale také vyšší uhlovodíky, primární a sekundární alkoholy, mono a diketony. Tyto látky přecházejí v průběhu izolace lipidů do lipidové části. Důvodem je jejich malá polarita. Důležitou steroidní látkou je cholesterol, který je v organismu důležitý pro tvorbu steroidních hormonů a žlučové kyseliny. Dále do doprovodných lipidů řadíme například vitamin E či vitamin D [1, 3, 4].

2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhým alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Zpravidla bývají nevětvené, některé mastné kyseliny nacházející se v lipidech mohou mít i aromatický charakter. Přírodní MK mají obvykle sudý počet uhlíků a vyskytují se hlavně v podobě esterů. Některé MK se nacházejí i v neesterifikované formě. Tyto sloučeniny se nazývají volné mastné kyseliny. Mastné kyseliny mohou být také nasycené, nebo nenasycené [1–3, 7].

V procesu zrání sýrů vznikají VMK jako produkt lipolýzy, katabolismu aminokyselin a fermentace laktózy. Volné mastné kyseliny jsou produkovány také bakteriemi obsahující enzymy s lipolytickou aktivitou, které jsou schopné hydrolyzovat mléčný tuk [8].

2.3.1 Klasifikace mastných kyselin

Z potravinářského hlediska se mastné kyseliny dělí do těchto skupin:

- nasycené mastné kyseliny,
- nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou,
- nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami,
- mastné kyseliny s trojnými vazbami a s několika substituenty (rozvětvené, cyklické, s kyslíkatými, sirnými nebo dusíkatými funkčními skupinami) [1].

Mastné kyseliny jsou vedle systematického pojmenování nazývány i triviálně, například podle místa, kde se nejčastěji vyskytují [1].

2.3.2 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny (*Saturated Fatty Acids* – SAFA) jsou charakteristické tím, že neobsahují dvojnou vazbu. Nacházejí se v tuhé formě a jejich strukturu tvoří obvykle rovný, nerozvětvený uhlíkatý skelet o 4 až 60 atomech. Mají nejčastěji sudý počet atomů uhlíku. Hlavním zástupcem těchto kyselin je kyselina palmitová a stearová [1, 4].

V tuku mléka jsou typicky přítomny také mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Zpravidla to bývá kyselina máselná, kapronová, myristová, stearová [3, 4].

2.3.3 Nenasycené mastné kyseliny s jednou a více dvojnými vazbami

Nenasycené mastné kyseliny (*Monounsaturated Fatty Acids* – MUFA; *Polyunsaturated Fatty Acids* – PUFA) jsou považovány za olejovité látky, které obsahují jednu dvojnou vazbu uloženou zpravidla uprostřed řetězce, nebo obsahují více dvojných vazeb izolovaných obvykle v intervalu C₁₀ až C₁₅ po třech atomech uhlíku. Dvojně vazby převážně tvoří konfiguraci *cis*, díky které dochází ke vzniku rigidního ohybu v alifatickém řetězci a k následnému zauzlení struktur. Hlavním představitelem MUFA je kyselina olejová a PUFA je kyselina linolová [4, 7].

Hlavním zdrojem nenasycených mastných kyselin jsou rostlinné oleje. Při ztužování rostlinných tuků může docházet ke změně konfigurace *cis* na *trans*. Tento jev bývá nežádoucí, protože v místě dvojně vazby může docházet k oxidaci, tzv. žluknutí tuků. K oxidaci může docházet také při zahřívání na vyšší teploty [4].

V mléčném tuku se vyskytují nenasycené MK od 2–46 %. Je to především kyselina olejová, ve stopovém množství kyseliny linolová, kaprolejová a palmitolejová, zaujímající asi 4 % [1].

2.3.4 Esenciální a neesenciální mastné kyseliny

Dalším dělením MK je na esenciální a neesenciální. Esenciální MK jsou takové kyseliny, které si organismus nemůže sám nasyntetizovat, a proto je nutné tyto kyseliny anebo jejich prekurzory dodávat tělu pomocí potravy. Esenciální MK jsou nezbytné pro růst, reprodukci a zdraví člověka. Bývají to nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami z řady n-3 a n-6. Za esenciální mastnou kyselinu považujeme linolovou a α -linolenovou kyselinu. V organismu člověka se tyto kyseliny prodlouží a desaturují. Neesenciální mastné kyseliny si organismus umí vytvořit sám [1, 7].

2.4 Charakteristika sýrů

Vzhledem k zaměření této práce je v následujících kapitolách stručně uvedena charakterizace, rozdělení a způsob výroby sýrů. Hlavní pozornost je pak věnována sýrům s vysokodohřívanou sýřeninou.

Sýr je bílkovinný koncentrát z mléka obsahující tuk, sacharidy, vodu, minerální látky a vitaminy. Podstatou vzniku sýru jsou chemické a fyzikální změny vznikající za přítomnosti určitého typu mikroorganismu, který dodá sýru jeho charakteristické vlastnosti. Vše, co tvoří pevnou část, tzn. kromě vody, se nazývá sušina, která tvoří cca 2/3 obsahu sýru. Obsah sušiny výrazně ovlivňuje chuť i tvrdost sýru. Čím déle se sýr nechává zrát, tím více klesá obsah vody a sýr se stává chuťově výraznější. Základní složkou sušiny je bílkovina kasein, tvořící strukturu sýru vznikající při srážení mléka při sýření [9, 10].

2.4.1 Obecný princip výroby sýrů

Hlavní surovinou pro výrobu sýrů je mléko, které musí být kvalitní a dobře se srážet. Mléko je třeba tepelně ošetřit – pasterovat. Pro každý typ sýru se používá k ošetření jiná teplota. Dále se v mléku upravuje obsah tuku, přidává se chlorid vápenatý ke zdokonalení syřitelnosti, zlepšuje se mikrobiologická jakost filtrací a příp. baktofugací, přidává se

barvivo a čisté kultury. To vše v závislosti na požadovaném typu sýru. Během výroby dochází k tzv. prokysání, při kterém dochází k fermentaci laktózy. Vlastní srážení probíhá buď vlivem kyseliny mléčné, která vzniká z laktózy (kyselé srážení), nebo enzymovým syřidlem (sladké srážení-sýření). K sýření se mohou používat oba způsoby současně v různém poměru. Samotné sýření je fyzikálně-chemický jev, při kterém vzniká z kaseinátu vápenatého nerozpustný parakaseinát vápenatý. Mléko sražené na tuhou, gelovitou hmotu se pokrájí a rozdrobí na zrno. Během následujících procesů dochází k odstranění syrovátky od zrna. Další úpravou zrna je dohřívání, dosoušení a následné formování, solení, popř. zrání v závislosti na typu sýra [10, 11].

2.4.2 Rozdělení sýrů

Rozdělení sýrů není jednoduché a nelze je univerzálně rozdělit. Sýry se proto dělí podle základních kroků v technologii, nebo podle konečných vlastností. Těmito aspekty jsou použité suroviny, druh mléka, obsah sušiny, obsah tuku v sušině, způsob srážení mléka a způsob zrání sýru [11].

Podle použité suroviny rozeznáváme sýry:

- přírodní,
- tavené [11].

Přírodní sýry se vyrábí přímo z mléka, tavené sýry jsou vyráběny ze sýrů přírodních, které projdou řadou úprav [11].

Dle použitého mléka dělíme sýry na sýry z kravského, ovčího, kozího mléka apod. [11].

Podle obsahu sušiny dělíme sýry na:

- tvrdé (obsah vody maximálně 45 %),
- měkké (obsah vody minimálně 45 %) [11].

Podle procentuálního zastoupení tuku v sušině rozlišujeme:

- vysokotučné (nad 60 %),
- plnotučné (45-60 %),
- polotučné (25-45 %),
- nízkotučné (10-25 %),
- odtučněné sýry (pod 10 %) [11].

Podle způsobu srážení mléka existují tři druhy sýrů:

- sýry vzniklé pouze kyselým srážením,

- sýry vzniklé srážením pomocí syřidla a následné prokysání působením mikroorganismů,
- sýry vzniklé působením syřidla a kyseliny mléčné [11].

Dle způsobu zrání dělíme sýry na:

- čerstvé sýry (nezrající),
- sýry zrající v celé hmotě,
- sýry zrající od povrchu dovnitř [10, 11].

2.4.3 Přírodní sýry

Do této skupiny patří všechny sýry, které jsou po dokončení výrobní technologie způsobilé ke konzumaci, nebo určené pro další zpracování. V této kategorii rozlišujeme kyselé a sladké sýry [12].

Kyselé sýry jsou sýry, u kterých se při srážení nepoužívá enzymatické koagulace působením syřidla. Mléko je sráženo kyselinou mléčnou vzniklou z laktózy působením mikroorganismů čistých kultur. Kyselé sýry jsou vyráběny z odstředěného mléka a jsou podrobeny procesu zrání. U nás jsou hlavními zástupci těchto sýrů Olomoucké tvarůžky [12].

Sladké sýry představují skupinu sýrů, které vznikají srážením mléka při použití enzymů v syřidle. Sladké sýry tvoří širokou škálu, a proto je dělíme na další podskupiny:

- plísňové; sýry, u kterých se při zrání používají ušlechtilé plísně rodu *Penicillium*. např. Hermelín a Niva, resp. obojí,
- bílé; jsou charakteristické tím, že se po vytvarování a prokysání jsou ukládány do slaného nálevu, např. Balkánský sýr a Mascarpone,
- měkké; jejich konzistence je měkká až roztíratelná a během výroby se sýřenina nedohřívá, např. Lučina, Romadúr a Blatácké zlato,
- polotvrdé; tvoří mezistupeň mezi měkkými a tvrdými sýry, např. Maršovský sýr,
- tvrdé; vyrábějí se ve velkých kusech a jsou považovány za „pravé“ sýry, dále se dělí na sýry s nízkodohříváním, např. Eidam, a s vysokodohříváním sýřeninou, jako je Ementál a Moravský bochník [10, 12].

2.5 Sýry s vysokodohříváním sýřeninou

O sýrech s vysokodohříváním sýřeninou se mluví jako o sýrech švýcarského, nebo ementálského typu. Patří mezi tvrdé, plnotučné sýry zrající v celé hmotě a zahrnují sýry typu Moravský bochník, které jsou analyzovány v experimentální části této práce [12, 13].

2.5.1 Historie Moravského bochníku

Moravský bochník je sýr původem z tuzemska. Vzorem pro jeho výrobu se stal Ementál. V dobách, kdy v mlékárnách pracovaly hlavně ženy, byla manipulace s těžkými bloky ementálského sýru obtížná. Tento problém vyřešila vhodná alternativa. Bloky Moravského bochníku vážily asi o 45 kg méně, než ementál a v dobách před první světovou válkou se jednalo bezesporu o sýr, který byl výrobní technologií i s procesem zrání velice blízký sýru Ementál. Rozdíl spočíval ve velikosti ok. Sýr Moravský bochník měl na průřezu menší oka než Ementál. Pro výrobu se používaly termofilní ementálské sýrařské kultury, zejména *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*. Sýr se nechával zrát v několika sklepech a v průběhu zrání se potíral lněným olejem. Dozrálé sýry měly elastickou konzistenci, rovnoměrně rozložení ok a nasládlou oříškovou chuť. Dnes se vyrábí tzv. Moravský blok. Tento sýr liší od původního provedení tím, že již neobsahuje oka [10, 14].

2.5.2 Výroba sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou

Počáteční fáze výroby sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou je obdobná s výrobou jiných sýrů, avšak musí být splněna vysoká kvalita mléka. Další podmínkou je mikrobiální čistota. Kontaminace by mohla vést k znehodnocení sýrů při výrobě. K výrobě sýrů se používají speciální sýrařské kultury, zajišťující správnou tvorbu ok a jsou přidávány do mléka před jeho srážením [15, 16].

Mléko po vyčištění a standardizaci prochází šetrnou pasterací při teplotě 72–74 °C, aby se nevysrážely syrovátkové bílkoviny, které by posléze odcházely do syrovátky. To by mohlo mít negativní dopad na konzistenci a zrání sýru. Upravené mléko se v další fázi výroby syří. K sýření se používá syřidlový enzym ze žaludku telat – chymozin. Samotné sýření probíhá v sýrařských vanách a/nebo kotlích s duplikátorovými stěnami, které mohou mít funkci ohřívání, nebo chlazení. Výsledkem sýření je sýřenina, která má konzistenci tuhé gelovité hmoty; pokrájí se pomocí tzv. sýrařských harf a rozdrobí na zrno 2–4 mm. Při tomto procesu se sýřenina pere v malém množství vody, nebo vůbec. Takto vzniklá zrna se posléze dohřívají na teplotu 48–55 °C, což je pro tyto sýry charakteristické. Sýry typu Moravský bochník se dohřívají na nižší teplotu (48–50 °C). Při teplotě dohřívání se zrno dosouší, aby získalo požadovanou tuhost. Následuje formování, kde se po odstranění syrovátky syrovina plní do forem a lisuje se. Lisování syroviny probíhá v hydraulických nebo pneumatických lisech a trvá asi 24 hodin. Tvrdé sýry se lisují při vysokých tlacích. Během drobení, dohřívání, formování a lisování vzniká syrovátka, která se z procesu výroby odstraňuje. Po lisování se sýry namáčí do tzv. solných lázní obsahujících roztok chloridu sodného na 2–3 dny. Tento proces zastaví prokysání, které trvá přibližně 24 hodin. Následně po prosolení se sýry nechají oschnout a jsou připraveny ke zrání [10, 15].

Zrání je proces, kde dochází ke změnám v sýru působením mikrobiálních kultur a zbytkové účinnosti enzymů syřidla. Klasické zrání sýru probíhá volně bez zracích obalů a je rozděleno do několika fází. V první fázi se sýr uchovává v chladném sklepech při 10 °C po dobu 3 až 4 týdnů. V této fázi dochází ke stabilizaci složení sýru. V následujícím

kroku sýry zrají v tzv. kvasném sklepe při teplotě 22–24 °C. Zde dochází ke tvorbě ok. Tomuto procesu se také říká otevírání sýru a je třeba zabezpečit správnou tvorbu ok a jeho neporušení v důsledku praskání. Posléze se sýr přemístí zpět do chladného sklepa, kde zraje po dobu 2–3 měsíců. V této fázi je nutné udržovat vysokou relativní vlhkost vzduchu; při nedodržení dochází k nadměrnému vysychání produktu. Tento klasický způsob zrání je poměrně náročný, dochází k úbytku hmotnosti sýru a ke tvorbě nežádoucí kůry. Uplatňují se proto jiné alternativy, např. zrání ve speciálních foliích a zracích bednách, nebo zrání pouze v chladném sklepe, aby nedocházelo k nadměrné tvorbě ok, jako je tomu v případě sýru typu Moravský bochník. U těchto sýrů probíhá zrání při 8–10 °C a zrání v předkvasném a kvasném sklepe se vynechává [10–12].

Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou se vyrábějí v podobě velkých bloků a bochníků, které se expedují jako hranoly nebo výseče, vakuově balené do plastových obalů. Sýry mají tuhou, ale zároveň vláchnou konzistenci. Síla kůry závisí na způsobu zrání. Při rozkrojení jsou u klasických ementálských sýrů na řezu patrná oka velikosti vlašského ořechu a směrem ke středu se zvětšují. Takový výrobek má příjemně jemnou a nasládlou vůni s mírně nahořklou mandlovou chutí. Jak již bylo zmíněno, Moravský bochník má na řezu malé množství drobných ok, popř. nemá žádná oka. Jeho chuť je nasládlá a méně výrazná [11, 12].

2.5.3 Složení sýrů

Sýr jako koncentrované mléko obsahuje řadu nezbytných látek, které z něj dělají významnou potravinu ke konzumaci. Sýr je tvořen bílkovinami, sacharidy, tukem, vodou, minerálními látkami a vitaminy [17].

Bílkoviny v sýru tvoří až 40 % a jsou složeny převážně z kaseinových proteinů. Kaseinový komplex tvoří 4 frakce:

- α_1 -kasein,
- α_2 -kasein,
- β -kasein,
- κ -kasein,

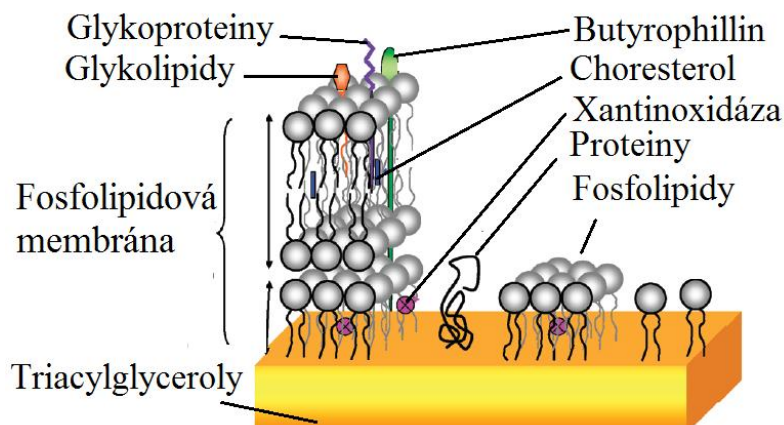
a všechny frakce jsou fosfoproteiny [15].

V mléce se nacházejí mimo kaseinových proteinů také syrovátkové proteiny. V průběhu procesu výroby sýra přechází většina syrovátkových proteinů do syrovátky, která je průběžně odstraňována. V konečném produktu tedy zůstává jen 2–3 % těchto bílkovin [18].

Obsah tuku v sýru je závislý na použitém mléku a procesu výroby. Samotný tuk působí jako rozpouštědlo pro látky způsobující aroma, což umožňuje jejich setrvání v produktu po delší dobu [19].

V mléce rozptýlen ve formě emulze. Tukové kapénky jsou obaleny třívrstvou membránou (viz Obr. 2) bohatou na fosfolipidy, glykoproteiny, enzymy a cholesterol atd.

Vnitřek tukových kapének je tvořen triacylglyceroly, které představují až 98 % lipidů z celkového množství mléčného tuku [20].



Obr. 2.: Struktura membrány kapénky mléčného tuku [20]

Mléčný tuk obsahuje mastné kyseliny o kratších až středních řetězcích, které mají teplotu tání shodnou s teplotou lidského těla. Díky této skutečnosti je mléčný tuk považován za dobře stravitelný. Stravitelnost mléčného tuku se pohybuje okolo 90 %. Obsah tuku v sýru je na obalech uváděn jako obsah tuku v sušině. K výpočtu absolutního obsahu tuku se používá vztah (1)

$$T = \frac{S \cdot tuk_{vs}}{100}, \quad (1)$$

kde T značí absolutní obsah tuku (%), S je obsah sušiny (%) a tuk_{vs} určuje obsah tuku v sušině (%) [12, 17].

Tuk v sýru zpravidla obsahuje cca 66 % SAFA, 30 % MUFA a 4 % PUFA. Z nutričního hlediska je sýr významným zdrojem tuku. Z nasycených MK v mléce zvyšuje cholesterol v krvi pouze kyselina laurová, myristová a palmitová [18].

Mléčný cukr neboli laktóza tvoří majoritní část sacharidů v mléčných produktech. Laktóza se vyskytuje ve dvou anomerech: α -laktóza a β -laktóza. Je to disacharid, který je tvořen glukózou a galaktózou. Je málo odolná vůči mikrobiálnímu rozkladu, což může vést ke kažení produktů. Sýry obsahují minimální množství laktózy, protože její převážná část odchází do syrovátky. Můžeme tedy říci, že sýr je vhodná potravina i pro osoby s intolerancí laktózy [13].

Sýr jako zdroj minerálních látek a vitaminů obsahuje především vápník a hořčík. Další minerální látky tvoří oxidy, chloridy a sírany. Většina látek je rozpuštěna ve vodné fázi mléka. Minerální látky se mohou také vázat na bílkoviny. Obsah minerálních látek se mění v závislosti na výrobě. Je třeba brát v úvahu, že sýry se při výrobě solí, tudíž obsahují vyšší obsah chloridu sodného. K vitaminům zastoupeným v sýru patří vit A, B2, B12 a kyselina pantotenová [17].

Každý sýr má své aroma, k němuž mohou přispívat i některé, především těkavé, mastné kyseliny. V sýrech švýcarského typu to je kyselina propionová, udávající sýru

oříškové aroma. Další kyselinou je octová, dodávající sýru palčivý až octový podtext. Kyselina 3-methybutanová je zodpovědná za typický pach sýru [21].

2.5.4 Kultury používané při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou

Mikroorganismy jsou nezbytnou součástí všech druhů přírodních sýrů a hrají důležitou roli jak při výrobě, tak při zrání. Mikrobiální (startovací) kultury mohou být buď definované mikroorganismy, nebo se mohou vyskytovat přirozeně v mléce jako směs nedefinovaných kmenů. Patří sem nejčastěji bakterie *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactococcus lactis* [22].

Ve výrobě sýrů se obecně jako základ používají smetanové mezofilní kultury. K výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou se používají vedle mezofilních kmenů i termofilní bakterie mléčného kvašení. Společným znakem bakterií mléčného kvašení je tvorba kyseliny mléčné z fermentovatelných sacharidů. K nejpoužívanějším mikroorganismům patří bakterie rodu *Lactobacillus*. Tyto grampozitivní bakterie mohou být buď fakultativně heterofermentativní (*L. casei*), nebo obligátně homofermentativní (*L. helveticus*). Fakultativně heterofermentativní bakterie jsou schopny fermentovat hexózy na kyselinu mléčnou, nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. *L. casei* se v sýraštví používá jako zpomalovač produkce kyseliny propionové, která je odpovědná za typický pach sýra a je také odpovědný za tvorbu těkavých kyselin. Obligátně homofermentativní bakterie fermentují pouze hexózy na kyselinu mléčnou. Termofilní kultura *L. helveticus* produkuje kyselinu mléčnou v obou izomerech [23, 24].

Při výrobě sýrů švýcarského typu se jako startovací kultury používají termofilní bakterie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Z těchto dvou bakterií je *Streptococcus thermophilus* považován jako hlavní producent kyseliny mléčné. Optimální růstová teplota termofilních kultur je 30–40 °C. Termofilní laktobacily, které obsahují laktózovou permeázu a β -galaktosidázu, metabolizují přednostně glukózu před galaktózou, což vede k převaze kyseliny octové, která nevytváří žádoucí oříškovou chuť, jako u propionových bakterií produkujících tuto kyselinu v ekvimolárním množství s kyselinou propionovou [24, 25].

Jako smetanová kultura se používají především bakterie rodu *Lactococcus*. Do této mezofilní skupiny patří bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, která jako homofermentativní bakterie tvoří v mléce asi 0,7 % kyseliny mléčné. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* má schopnost fermentovat citran za přítomnosti fermentovatelného sacharidu na acetoin, ze kterého se posléze vzdušnou oxidací vytváří aromatická látka máslové příchutě diacetyl. Dále vytváří CO₂ a kyselinu octovou. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* je v mlékárenství nejrozšířenějším mikroorganismem. Tato bakterie se v mléce velmi dobře rozmnožuje a nevytváří CO₂. V mléce tvoří 0,9 % kyseliny mléčné a ta sráží mléko při optimálních podmínkách (20–30 °C) do druhého dne. Další mikroorganismy používané v mléčném kvašení jsou bakterie rodu *Leuconostoc*, produkující také diacetyl z citrátu. Tyto bakterie jsou schopny vytvářet oba izomery kyseliny mléčné [18, 26].

2.6 Stanovení mastných kyselin v sýrech pomocí plynové chromatografie

Stanovení MK se skládá z několika kroků: extrakce tuku, esterifikace, tj. převedení na methylestery, jež jsou, jako vysoce těkavé a nízkopolární sloučeniny, ideální formou pro analýzu na plynovém chromatografu [27].

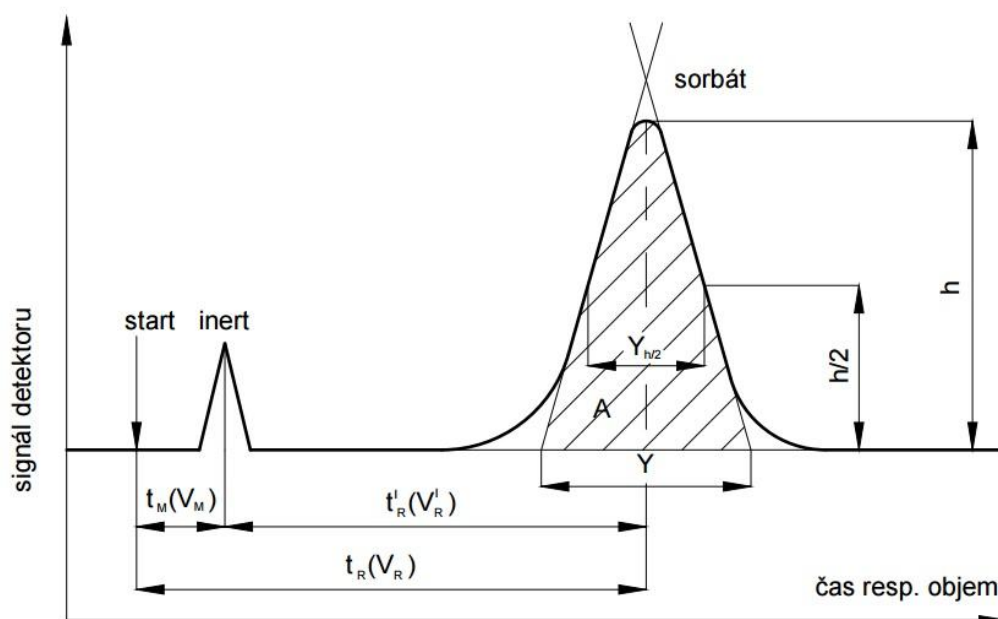
Pro stanovení mastných kyselin v sýru se v této bakalářské práci využívá metoda plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID – *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*). V následující části bude popsán princip a instrumentace plynové chromatografie (GC). Plynová chromatografie je obecně oblíbenou metodou pro stanovení těkavých látek, které lze převést do plynného stavu.

2.6.1 Princip plynové chromatografie

Plynová chromatografie je separační analytická metoda, která je založena na afinitě analyzované látky k mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé) fázi. V plynové chromatografii je mobilní fází plyn, který umožňuje transport složek látky v koloně. Nosný plyn bývá inertní a nesmí reagovat s analyzovanou látkou. Mezi mobilní a stacionární fází působí mezimolekulární síly a difuze. V průběhu procesu se jednotlivé složky látky zadržují na stacionární fázi a podle síly interakce opouštějí kolonu a jsou na výstupu detekovány. Zpravidla se podle mechanismu separace používají dva typy plynové chromatografie – adsorpční a rozdělovací. V adsorpční plynové chromatografii je mobilní fáze plyn a stacionární fáze pevná látka. Tato metoda se používá pro stanovení plynů a některých kapalin o nízké molekulární hmotnosti. V rozdělovací plynové chromatografii je stacionární fází film netěkavé kapaliny na povrchu tuhého nosiče vykazující minimální adsorpci [28, 29].

Pro plynovou chromatografii je typická tzv. eluční technika. Jedná se o vnesení vzorku na kolonu a následnou separaci a vymývání složek pomocí nosného plynu [29].

Výsledkem plynové chromatografie je chromatogram, tedy záznam odezvy detektoru v závislosti na čase v podobě tzv. chromatografických píků, které mají v ideálním případě Gaussovský tvar (viz Obr. 3). Z těchto píků lze určit několik parametrů: retenční čas t_R (V_R – retenční objem), mrtvý čas t_M (V_M – mrtvý objem), šířka Y , výška h a plocha píku A . Retenční čas t_R je časový interval počínající nástřikem vzorku do detekce složky detektorem (maximum chromatografického píku). Mrtvý čas t_M představuje dobu, kdy molekula analyzované látky je zadržována v mobilní fázi. Redukovaný retenční čas $t_{R'}$ ($V_{R'}$ – redukovaný retenční objem) je vyjádřen jako rozdíl retenčního času a mrtvého času. Jedná se o čas, který odpovídá době strávené ve stacionární fázi [30–32].



Obr. 3: Ideální chromatogram [31]

2.6.2 Instrumentace plynového chromatografu

Plynový chromatograf se skládá z několika částí a to ze zdroje nosného plynu, regulátoru, dávkovače, kolony, termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [33].

2.6.2.1 Zdroj nosného plynu

Pro plynovou chromatografii se jako nosný plyn používá plyn, který je zpravidla inertní. V závislosti na způsobu detekce se používá vodík, dusík, helium nebo argon. Zdrojem mobilní fáze jsou tlakové láhve a generátory. Některé detektory vyžadují další plyny (argon, vodík, dusík, kyslík). Všechny plyny je třeba před vstupem do zařízení zbavovat vodních par a nečistot. K tomu slouží molekulová síta a speciální katalyzátory [29, 34].

2.6.2.2 Regulátor a měřič průtoku

Na průtokové rychlosti je závislá celá chromatografická separace i některé detektory, proto je třeba zabezpečit požadovaný průtok. Průtok plynu je obvykle kontrolován dvoufázovým tlakovým regulátorem na tlakové láhvi a nějakým typem tlakového regulátoru, nebo průtokového regulátoru na přístroji, např. rotometrem na počátku kolony [35].

2.6.2.3 Dávkovače

Dávkovače (injektory) zajišťují přepravu vzorku do proudu nosného plynu, zároveň však převádí vzorek do plynného stavu. Dávkování většinou zprostředkovávají mikrostříkačky, či dávkovací mikroventily. Mikrostříkačky pronikají přes těsnění z vyhřívané silikonové gumy, tzv. septum a poté dochází k převedení vzorku na plynnou fázi. Dávkování je možno uskutečnit nad ústí kolony umístěné na konci injektoru (pro náplňové kolony) nebo přímo na kolonu (pro kapilární kolony). Pro dávkování vzorku přímo na kolonu existuje několik způsobů provedení: dávkování s děličem toku (*split*

injektor) pro analýzu vzorku s velkým množstvím analytu, dávkování bez děliče toku (*splitless injektor*) pro analýzu ředěných vzorků, dávkování přímo do kapilární kolony (*on column injektor*) pro vzorky se složkami rozkládajícími se těsně nad bodem varu, příp. dávkování programově zvýšenou teplotou vypařování vzorku [28, 29].

2.6.2.4 Kolony

V koloně dochází k samotné separaci látek. V plynové chromatografii jsou buď náplňové, nebo kapilární. Náplňové kolony jsou vyrobeny z kovu (hliník, měď, nikl, nerezová ocel), nebo ze skla. Mají vnitřní průměr 2–6 mm a jsou dlouhé 1–5 m. Kolony jsou spirálově zatočené. Oproti kapilárním kolonám mají větší kapacitu. Náplň pro adsorpční chromatografii tvoří absorbenty silikagel, aktivní uhlí a alumina. Dále se používají molekulová síta (hlinitokřemičitany). Pro rozdělovací chromatografii jako nosič slouží křemelina. Jako stacionární fáze se zde používá netěkavá inertní kapalina, která se volí podle povahy analyzovaného vzorku [29, 32].

Kapilární kolony jsou kolony, které mají vnitřní průměr 100–700 µm a jsou dlouhé v rozmezí 15–100 metrů. Mohou být vyráběné ze skla, křemene, plastu nebo kovu. Pro zvýšení odolnosti se křemenné kapiláry potahují vrstvou polymeru (polyimidu). Podle stacionární fáze nanesené na vnitřní stěnu rozděluje kolony na: kolony s kapalnou stacionární fází WCOT – *Wall-Coated Open Tubular*); kolony, kde na vnitřním povrchu kapiláry je nanášena vrstva pevného sorbentu (PLOT – *Porous-Layer Open Tubular*) a kolony s kapalnou stacionární fází zakotvenou na vnitřní stěně pomocí určitého nosiče (SCOT – *Support-Coated Open Tubular*) [29].

2.6.2.5 Termostaty

Termostaty zajišťují teplotní stabilitu injektoru, kolony a detektoru. Mohou být kapalinové, se vzduchovou lázní a hmotové. Nejčastěji se používají vzduchové termostaty, které jsou schopny rychle upravit teplotu [36].

2.6.2.6 Detektory

Detektory slouží k detekci separovaných látek v koloně. Jsou schopny převést signál v podobě změny složení pohyblivé fáze na elektricky měřitelnou veličinu. Detektory mohou reagovat na koncentraci, nebo hmotnost složky. Základními parametry, které pozorujeme u detektorů, je citlivost, odezva, šum vytvářeného signálu, rychlost odezvy, efektivní objem, nejmenší detekovatelné množství a lineární rozsah tj. závislost odezvy na koncentraci [29].

V plynové chromatografii existuje řada detektorů. Je to detektor: tepelně vodivostní (TCD – *Thermal Conductivity Detector*), plamenový ionizační (FID – *Flame Ionization Detector*), termo-ionizační (TID – *Thermionic Ionization Detector*), plamenový fotometrický (FPD – *Flame Photometric Detector*), fotoionizační detektor (PID – *Photo-Ionization Detector*) a detektor elektronového záchytu (ECD – *Electron-Capture Detector*) [35].

V této bakalářské práci je využíván plamenový ionizační detektor. FID patří mezi nejpoužívanější detektory. Používá se pro detekci sloučenin s C–H vazbami, ale

neposkytuje odezvu na permanentní plyny. Pro funkci FID detektoru je důležitá přítomnost pomocných plynů: H_2 jako palivo a vzduch jako oxidovadlo. Princip FID spočívá ve spalování nosného plynu s analytem pomocí plamene. Plamen je umístěn mezi dvěma elektrodami. Anodou je kovová část hořáku a katodou je kovová síťka umístěná nad plamenem. Nosný plyn s eluovanou látkou je přiváděn do plamene a zde dochází ke tvorbě radikálů H^\cdot , OH^\cdot a O^\cdot . Při této reakci vzniká velké množství tepla, což je příčinou pro tvorbu radikálů organických látek. Organické radikály se dále oxidují, dochází k přenosu určitého množství náboje mezi elektrodami a vytváří se signál. Plamenový ionizační detektor vykazuje výbornou stabilitu signálu, rychlou odezvu a malý efektivní objem. Detekce FID je závislá na průtoku nosného plynu a průtoku vodíku, což určuje teplotu prostoru [35, 36].

2.6.2.7 *Vyhodnocovací zařízení*

K vyhodnocení signálu z detektoru se dnes používají speciální softwarové programy. Výstupem chromatografie je již zmíněný chromatogram.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie pro extrakci lipidů

- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., Lach:ner, Česká republika
- Ethanol 96 % vol, AnalaR-NORMAPUR, Francie
- Diethylether p. a., PENTA, Česká republika
- Petrolether p. a., LACHEMA, Česká republika
- Methanol p. a., Lach:ner, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., ML Chemical, Česká republika

3.1.2 Chemikálie pro kyselou esterifikaci

- Bortrifluorid methanolický roztok 10 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Isooktan 99,7 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Chlorid sodný p. a., PENTA, Česká republika
- Destilovaná voda, FCH VUT
- Síran sodný bezvodý p. a., Lach:ner, Česká republika

3.1.3 Chemikálie pro stanovení mastných kyselin

- Hexan p. a., Lach:ner, Česká republika
- Směsný standard metylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix, SIGMA-ALDRICH, Německo

3.1.4 Laboratorní přístroje

- Váhy analytické GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Vodní lázeň se stojany, Julabo TW 2, Německo
- Topné hnízdo 100 ml, BRNĚNSKÁ DRUTĚVA v.d., Česká republika
- Plynový chromatograf TRACE GC 2000, (ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie) s plameno-ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a s kapilární kolonou DB 23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm
- PC-pracovní stanice, POWER PROFIT
- Digestor
- Vakuová rotační odparka, KIKA®-WERKE, Německo
- Lednice a mrazák ERB nerez, Elektrolux, Švédsko
- Sušárna, Memmert,

3.1.5 Laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatická mikropipeta 100–1 000 μl, labopette®, Německo
- Automatická mikropipeta 100–1 000 μl, sartorius, Německo
- Automatická mikropipeta 10–100 μl, BIOHIT, Finsko
- Vialky

- Nože, špachtle, struhadlo
- Parafilm, PECHIENY PASTIC PACKAGING

3.1.6 Plyny pro plynový chromatograf

- Vodík 5.5, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Dusík 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

3.2 Analyzované vzorky

Pro experimentální část této práce byly použity modelové vzorky přírodních sýrů Moravský Bochník (45 % tuk v sušině, 60 % sušiny), které poskytla Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Tyto vzorky byly vyrobeny standardním technologickým postupem během června 2016. Data výroby jsou uvedeny v Tab. 1.

K výrobě sýrů bylo použito 35 litrů nestandardizovaného mléka. Mléko bylo pasterováno na teplotu min. 72 °C s výdrží 30 sekund. Dále bylo napuštěno do výrobníku a vytemperováno na 32 °C. Poté bylo inokulováno lyofilizovanými čistými mlékařskými kulturami Flora Danica, LH B02 a STI-12 (Chr. Hansen, Dánsko) v požadovaném poměru (Tab. 2 a Tab. 3). Po 15 minutách byl za stálého míchání přidán 36% roztok CaCl_2 (50 ml na 100 litrů mléka) a zředěné syřidlo 950 IMCU/ml, CHY-MAX M, (Chr. Hansen, Dánsko; 3,2 ml na 100 l mléka). Mléko bylo ponecháno v klidu pro srážení po dobu 30 minut. Vzniklá syřenina byla prokrájena sýrařskou harfou na hranoly velikosti cca 2 × 2 cm a ponechána 10 minut v klidu, následně byla rozdrobena (cca 10 minut) do podoby rovnoměrně velkého zrna. Zrno bylo vytužováno mícháním dalších 10 minut. Pomocí pláště výrobníku byla za stálého míchání zvýšena teplota zrna na teplotu 47 °C a zrno bylo při této teplotě dosoušeno cca 60 minut.

Hotové zrno bylo vypuštěno do předlisovací vany vyložené plachetkou a předlisováno vlastní hmotností nebo pomocí mírného tlaku po dobu 15 minut. Předlisovaná syřenina byla rozkrojena, vložena do lisovacích forem a lisována po dobu 2,5 hodin. Po 90 minutách lisování byl sýr otočen. Bloky sýra o hmotnosti 1,5 kg byly soleny v solné lázni (koncentrace 20 % w/w, teplota 8 °C) po dobu 14 hodin; poté byly ponechány k oschnutí, zabaleny do smrštitelné polopropustné folie a uloženy do zrací komory při teplotě 8–14 °C. Vzorky pro tuto práci byly odebrány po 4 měsících zrání.

Vzorky byly skladovány v mrazicím zařízení do –20 °C. Před analýzou byly rozmrazeny a uchovávány v uzavřené nádobě v lednici do 7 °C max. několik hodin.

Pro srovnání byl analyzován také komerční vzorek přírodního sýru Moravský Bochník a komerční vzorek sýru Ementál (plátky, 45 % tuk v sušině, sušina 60 %).

3.2.1 Použité mikrobiální kultury

Pro výrobu modelových sýrů byly použity tři komerčně dostupné lyofilizované kultury vhodné k přímému zaočkování do mléka (Chr. Hansen, Dánsko). Je to Mezofilní kultura Flora Danica – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc* spp. a termofilní kultury LH-B02 – *Lactobacillus helveticus* a STI-12 – *Streptococcus thermophilus*.

Tab. 1: Datum výroby vzorků

	Vzorek			
	V1	V2	V3	V4
Datum výroby	22. 6. 2016	27. 6. 2016	28. 6. 2016	29. 6. 2016

Tab. 2: Přehled modelových vzorků (hmotnostní složení kultur).

		Vzorek			
		V1	V2	V3	V4
Složení kultur (g)	LH B02	0,77	0,77	0,77	1,4
	STI-12	0,37	0,37	0,46	0,7
	Flora Danica	3,83	2,87	3,83	0,7
	Celkem	4,97	4,01	5,06	2,8

Tab. 3: Přehled modelových vzorků (kombinace kultur v %)

	Kultura	Složení kultury	Vzorek			
			V1	V2	V3	V4
Poměr kultur (%)	LH B02	<i>Lactobacillus helveticus</i>	15	19	15	50
	STI-12	<i>Streptococcus thermophilus</i>	8	9	9	25
	Flora Danica	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	77	72	76	25
		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>				
		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				
		<i>Leuconostoc</i> spp.				

3.3 Použité metody a pracovní postupy

3.3.1 Extrakce lipidů ze vzorku sýra (ČSN EN ISO 1735:2005)

Rozmražené vzorky byly nastrouhány na jemném struhadle a promíchány. Do zkumavky bylo naváženo množství 1 g s přesností na čtyři desetinná místa. Poté bylo přidáno 5 ml kyseliny chlorovodíkové a vzniklá směs byla zahřívána v termostatu při 80 °C po dobu deseti minut s občasným promícháním. Na konci temperace se vzorek úplně rozložil a směs se zbarvila do fialova. Po ochlazení byla směs kvantitativně převedena pomocí 5 ml ethanolu do dělicí nálevky. Ke směsi bylo poté přidáno 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru. Po přidání každého rozpouštědla v uvedeném pořadí se směs silně třepala po dobu jedné minuty. Posléze se směs nechala odstát přibližně 30 minut při laboratorní teplotě 22 °C do rozdělení fází (viz Obr. 4). V následujícím kroku byla opatrně odebrána

horní fáze a přenesena do předem zvážené destilační baňky s kulatým dnem o objemu 50 ml. Následně byla provedena druhá a třetí extrakce obdobným postupem, ale s polovičním množstvím rozpouštědel (4,5 ml diethyletheru a 4,5 ml petroletheru) [37].

Po spojení všech tří částí extraktů bylo celkové množství tuku vysušeno na vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa.



Obr. 4: Dělicí nálevka po extrakci organickými rozpouštědly (vrchní organická fáze)

3.3.2 Kyselá esterifikace pomocí methanolického roztoku bortrifluoridu (metoda pro TAG)

K vyextrahovanému tuku v destilační baňce byly přidány 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a očištěný varný kamínek. Směs v destilační baňce byla zahřívána v topném hnízdě pod zpětným chladičem po dobu cca 7 minut do vymizení kapiček tuku. Během tohoto kroku se s baňkou jemně kroužilo, aby se zabránilo usazení hydroxidu sodného na stěně. Následně bylo přidáno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs se nechala vařit 10 minut. Po uplynulé době se var zastavil a ke směsi byly přidány 3 ml isooktanu. Následně byla destilační baňka doplněna asi 20 ml nasyceným roztokem chloridu sodného a protřepávána po dobu 15 sekund. Poté byla doplněna nasyceným roztokem chloridu sodného až po hrdlo a ponechána v klidu cca 5 minut pro oddělení fází. Po uplynulé době byly z horní fáze odebrány 1–2 ml, které byly přeneseny do vialky o objemu 4 ml. Aby se odstranily stopy vlhkosti, byl do vialky přidán bezvodý síran sodný. Z takto upravené směsi methylesterů (ME) byl odebrán 1 ml k chromatografické analýze.

Příprava methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Ve 100 ml methanolu byly ohříváním rozpuštěny 2 g hydroxidu sodného. Takto připravený roztok byl uchováván v lednici nejdéle po dobu 3 měsíců.

3.3.3 Kyselá esterifikace pomocí methanolického roztoku bortrifluoridu (metoda pro VMK)

K vyextrahovanému tuku v destilační baňce byl přidán očištěný varný kamínek. Následně bylo přidáno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs se nechala vařit 5 minut. Po uplynulé době se var zastavil a ke směsi byly přidány 3 ml isooktanu. Následně byla destilační baňka doplněna asi 20 ml nasyceným roztokem chloridu sodného a protřepávána po dobu 15 sekund. Poté byla doplněna nasyceným roztokem chloridu sodného až po hrdlo a ponechána v klidu cca 5 minut pro oddělení fází. Po uplynulé době byly z horní fáze odebrány 1–2 ml, které byly přeneseny do vialky o objemu 4 ml. Aby se odstranily stopy vlhkosti, byl do vialky přidán bezvodý síran sodný. Z takto upravené směsi methylesterů byl odebrán 1 ml k chromatografické analýze.

3.4 Stanovení methylesterů mastných kyselin metodou GC-FID

Plynový chromatograf, na kterém byla provedena analýza, je zobrazen na Obr. 5.

3.4.1 Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest Italia S. p. A)
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona DB 23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm
- Oven-teplotní program:
 - 60 °C 10 minut
 - Vzestupný gradient 12 °C. min^{-1} do 200 °C s výdrží 10 minut
 - Vzestupný gradient 5 °C. min^{-1} do 220 °C s výdrží 15 minut
 - Vzestupný gradient 10 °C. min^{-1} do 240 °C s výdrží 7 minut
- Vstup:
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Doba bezděličového dávkování: 5 minut
 - Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) 1 μl
- Nosný plyn:
 - Průtok dusíku: 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Plameno-ionizační detektor (FID):
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Průtok vzduchu: 350 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 - Průtok vodíku: 35 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 - Make-up dusíku: 30 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$



Obr. 5: Plynový chromatograf

3.4.2 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny v sýru byly stanoveny plynovým chromatogramem jako ME. Vzniklé chromatogramy vzorků resp. jejich retenční časy byly porovnány s retenčními časy standardů MEMK. Vzniklé plochy jednotlivých MEMK byly použity pro výpočet jejich koncentrace podle vztahu (2)

$$c_{\text{MEMK}} = \frac{c_s \cdot P_{\text{MEMK}}}{P_s}, \quad (2)$$

kde c_{MEMK} vyjadřuje koncentraci methylesterů ve vzorku ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), P_{MEMK} značí plochu píku MEMK, c_s označuje známou koncentraci standardu ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a P_s jeho plochu.

Vypočítaná koncentrace MEMK se přepočítá na koncentraci samotných mastných kyselin podle následujícího vztahu (3):

$$c_{\text{MK}} = \frac{c_{\text{MEMK}} \cdot M_{\text{MK}}}{M_{\text{MEMK}}}, \quad (3)$$

kde c_{MK} vyjadřuje koncentraci mastných kyselin ve vzorku ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), M_{MK} je molární hmotnost mastných kyselin a M_{MEMK} jejich methylesterů. V našem případě platí $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \approx \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Poté se obsah MK přepočítá na 1 g sýra dle vztahu (4):

$$c = \frac{c_{\text{MK}} \cdot V_{\text{ISO}}}{m}, \quad (4)$$

kde c je obsah MK v 1 g sýra ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), V_{ISO} vyjadřuje objem isooktanu při esterifikaci (ml) a m označuje navážku sýra (g).

3.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu MS Excel 2007. Každý vzorek byl analyzován dvakrát ($n = 2$). Výsledky jsou uvedeny ve tvaru aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ syra.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlého projektu, který probíhá ve spolupráci s Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně, a zároveň ve spolupráci s nejmenovaným výrobcem, který má zájem komerčně vyrábět sýry typu Moravský bochník. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně disponuje potřebným technologickým vybavením; jako základ byl zvolen standardní technologický postup pro výrobu ementálských sýrů, kde budou postupně zkoušeny různé varianty výrobních podmínek. Cílem bude nalézt takové podmínky výroby, aby byl dosažen produkt s vysokou nutriční hodnotou a senzorickou atraktivitou. Během výroby modelových sýrů bude sledována řada fyzikálních, chemických, mikrobiologických a senzorických parametrů, v rámci této práce to bude stanovení volných a vázaných MK, které jsou podstatnou složkou lipidů. Během zrání sýrů lipidy podléhají výrazným změnám a významným způsobem ovlivňují jejich senzorickou kvalitu.

První experimenty jsou zaměřeny na použití vhodných mikrobiálních kultur, resp. vhodného poměru jejich kombinace. Hlavním cílem této práce tedy bude posoudit vliv různých kombinací mikrobiálních kultur na obsah volných a vázaných MK v sýrech. Vzorky budou analyzovány v různých fázích zrání. V rámci této bakalářské práce byly analyzovány první vyrobené vzorky po čtyřech měsících zrání. Pro doplnění výsledků byly analyzovány i vzorky sýru Moravský bochník a Ementál. Tyto vzorky byly zakoupeny v obchodních řetězcích.

Obecně se při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou do mléka přidává mezofilní a termofilní kultura a v případě ementálských sýrů i propionová kultura (viz kap. 2.5.4). Zajímavé je, že se z dostupné literatury nepodařilo bezpečně zjistit, zda jsou propionové bakterie nezbytné i pro výrobu sýrů typu Moravský bochník. Tyto sýry nemají oka, a lze tedy předpokládat, že aplikace propionové kultury není nutná.

Pro výrobu modelových vzorků pro tuto práci byla proto použita klasická mezofilní aromatická kultura a dva typy termofilních kultur. Jejich složení je uvedeno v kap. 3.2.1. Celkem byly analyzovány čtyři vzorky vyrobené s použitím čtyř různých kombinací mikrobiálních kultur uvedených v Tab. 3. Vzorky V1–V3 jsou si z hlediska použitých kultur velmi podobné, ve směsi převažovala kultura mezofilní. U vzorku V2 byl mírně zvýšen obsah termofilní kultury LH B02 (*Lactobacillus helveticus*), vzorek V3 měl naopak nepatrně zvýšen obsah termofilní kultury STI-12 (*Streptococcus thermophilus*). U vzorku V4 byla provedena radikální změna, kdy ve směsi výrazně převažovala termofilní kultura LH B02. Výsledky modelových sýrů byly porovnány s komerčně dostupnými sýry stejného typu, tj. klasický Ementál a Moravský bochník, které byly podrobeny analýze za stejných podmínek.

Pro stanovení VMK i MK vázaných v TAG, je v prvním kroku potřeba vyextrahovat ze vzorku tuk. K tomu byla použita extrakce převzatá z normované referenční metody (ČSN EN ISO 1735:2005) o stanovení obsahu tuku. V přírodě jsou lipidy spojeny s cizorodými molekulami pomocí různých interakcí. Prostřednictvím vodíkových můstků, van der Waalsových a elektrostatických sil jsou molekuly lipidů navázány na molekuly proteinů a s uhlovodíky tvoří kovalentní vazbu. Pro zvýšení extrakce tuku

z analyzovaného materiálu je potřeba vzorek podrobit kyselé nebo bazické hydrolyze. V našem případě je použita kyselé hydrolyza kyselinou chlorovodíkovou. Tento krok je důležitý, protože samotné rozpouštědlo není schopno izolovat veškerý tuk, zvláště tuk navázaný na ostatní molekuly prostřednictvím kovalentních vazeb. Pro zajištění účinné extrakce se používají vybraná organická rozpouštědla v různých kombinacích. Pro extrakci TAG a VMK byla v tomto experimentu použita kombinace nepolárních rozpouštědel (diethylether a petrolether) [38].

Mastné kyseliny nejsou vhodné k přímému stanovení na plynovém chromatografu, proto byly převedeny na příslušné ME. Methylestery jsou ideální pro stanovení kvůli jejich vyšší těkavosti a nižší polaritě [27]. Pro kyselou esterifikaci vázaných MK a VMK byl vybrán methanolický roztok bortrifluoridu. Jedná se o nejčastěji používanou metodu a podle našich výsledků poskytuje použití katalyzátoru BF_3 nejvyšší výtěžnost MEMK [39].

4.1 Standardy methylesterů mastných kyselin

Pro stanovení MK byla v této práci použita metoda GC-FID. Přesný postup a podmínky stanovení jsou uvedeny v kap. 3.4. Identifikace a kvantifikace mastných kyselin ve vzorcích byla provedena na základě porovnání retenčních časů a výpočtu koncentrace prostřednictvím ploch píků MEMK ve standardu. Retenční časy, známé koncentrace standardů, plochy píků, molární hmotnost methylesterů a mastných kyselin jsou uvedeny v Tab. 4.

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 32 MK. V Tab. 5 a v Tab. 6 je uveden jejich přehled a obsah (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýru), tak jak byly identifikovány v jednotlivých vzorcích. Ukázky získaných chromatogramů jsou uvedeny v kapitole Přílohy.

Tab. 4: Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin.

Název MK	Retenční čas (min)	C_s ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Plocha píku ($\text{mv}\cdot\text{s}$)	M_{MEMK} ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	M_{MK} ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Máselná	13,39	0,04	367 958	102,13	88,11
Kapronová	18,28	0,04	2 825 843	130,19	116,16
Kaprylová	21,68	0,04	3 466 573	158,24	144,21
Kaprinová	24,15	0,04	3 824 882	186,30	172,27
Undekanová	25,26	0,02	2 083 691	200,32	186,30
Laurová	26,39	0,04	4 363 197	214,35	200,32
Tridekanová	27,59	0,02	2 160 471	228,38	214,35
Myristová	28,99	0,04	5 142 349	242,40	228,38
Myristolejová	29,72	0,02	2 165 183	240,38	226,36
Pentadekanová	30,61	0,02	2 198 462	256,43	242,40
Pentadecenová	31,55	0,02	2 002 343	254,41	240,39

Tab. 4 pokračování: Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin.

Název MK	Retenční čas (min)	C _S (mg·ml ⁻¹)	Plocha píku (mv·s)	M _{MEMK} (g·mol ⁻¹)	M _{MK} (g·mol ⁻¹)
Palmitová	32,63	0,06	11 862 097	270,46	256,43
Palmitoolejová	33,35	0,02	2 204 918	268,44	254,41
Heptadekanová	34,61	0,02	1 951 607	284,48	270,46
Heptadecenová	35,41	0,02	1 855 260	282,47	268,44
Stearová	36,79	0,04	6 146 507	298,51	284,48
Elaidová	37,20	0,02	2 123 704	296,50	282,47
Olejová	37,56	0,04	12 419 087	296,50	282,47
Linolelaidová	38,04	0,02	1 732 572	294,48	280,45
Linolová	38,86	0,02	5 671 779	294,48	280,45
γ-linolenová	39,69	0,04	1 789 686	292,46	278,44
Linolenová	40,60	0,02	1 986 463	292,46	278,44
Arachová	42,02	0,02	3 477 495	326,57	312,54
Eicosenová	43,03	0,02	2 041 954	322,53	308,51
Eicosadienová	44,97	0,02	1 641 102	322,53	308,51
Heneicosanová	45,38	0,02	1 676 667	340,59	326,56
Eicosatrienová 6	46,24	0,04	1 632 369	320,52	306,49
Arachidonová	47,10	0,02	1 269 034	318,50	304,47
Eicosatrienová 3	47,58	0,02	1 405 360	320,52	306,49
Eicosapentaenová	49,54	0,02	3 310 808	316,49	302,46
Behenová	50,04	0,02	1 303 750	354,62	340,59
Eruková	51,03	0,02	1 683 480	352,60	338,58
Docosadienová	53,00	0,02	1 489 194	350,59	336,56
Trikosanová	53,26	0,04	1 614 542	368,65	354,62
Lignocerová	56,70	0,02	3 029 313	382,67	368,65
Docosahexaenová	57,97	0,02	1 501 724	342,52	328,50
Nervonová	58,31	0,02	867 969	380,66	366,63

M – molární hmotnost

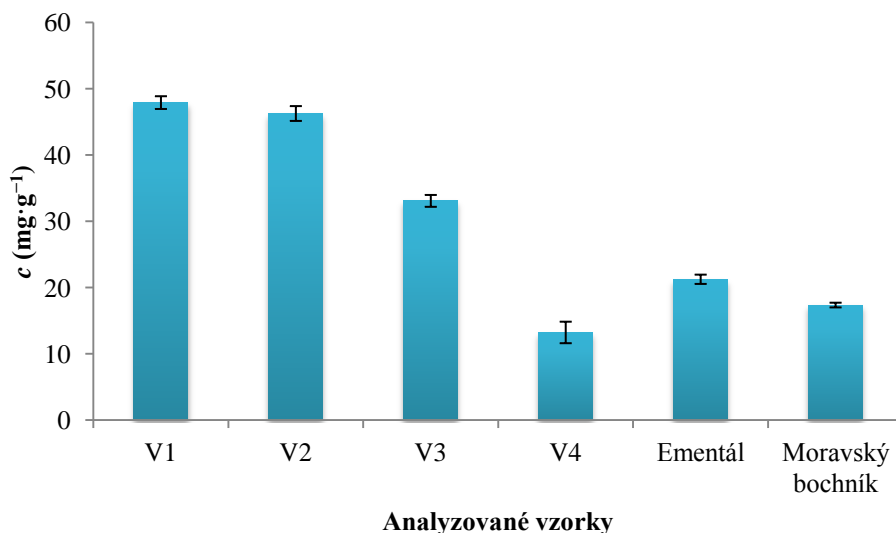
4.2 Identifikace a kvantifikace vázaných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

Vzhledem k tomu, že stanovením celkového obsahu MK není možné přesně postihnout jednotlivé lipidické frakce, pro lepší charakterizaci rozdílů mezi vzorky byl v rámci této práce sledován samostatně obsah MK vázaných v TAG a obsah VMK. V této kapitole je uveden a porovnán obsah vázaných MK. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.

Ve všech vzorcích bylo celkem identifikováno 32 vázaných MK. Ve vzorku V1 bylo nalezeno 26 MK, ve vzorku V2 bylo stanoveno 28 MK, vzorek V3 obsahoval 27 MK

a ve vzorku V4 bylo přítomno 24 MK. Z hlediska komerčních vzorků bylo v Ementálu 27 MK a v Moravském bochníku 25 MK.

Ve vzorku V1 byl celkový obsah MK stanoven na $47,91 \pm 0,96 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; ve vzorku V2 $46,26 \pm 1,12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; ve vzorku V3 $33,10 \pm 0,90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a vzorek V4 obsahoval $13,23 \pm 1,62 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ mastných kyselin. Obsah MK u komerčních vzorků byl stanoven pro Ementál na $21,25 \pm 0,70 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a pro Moravský bochník na $17,36 \pm 0,36 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

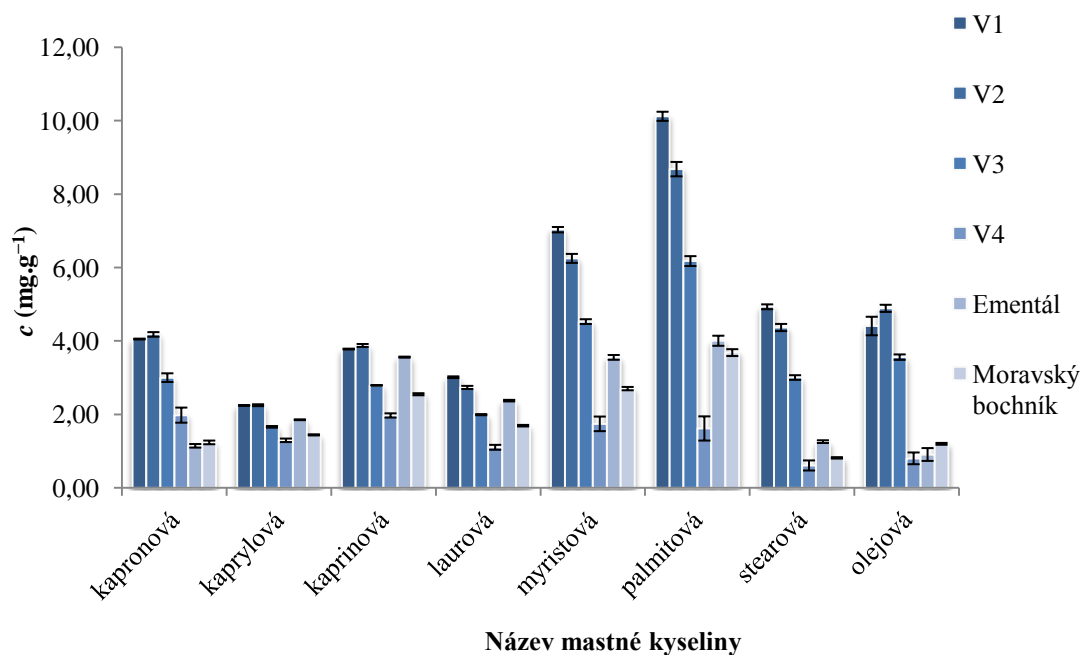


Obr. 6: Celkový obsah vázaných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra)

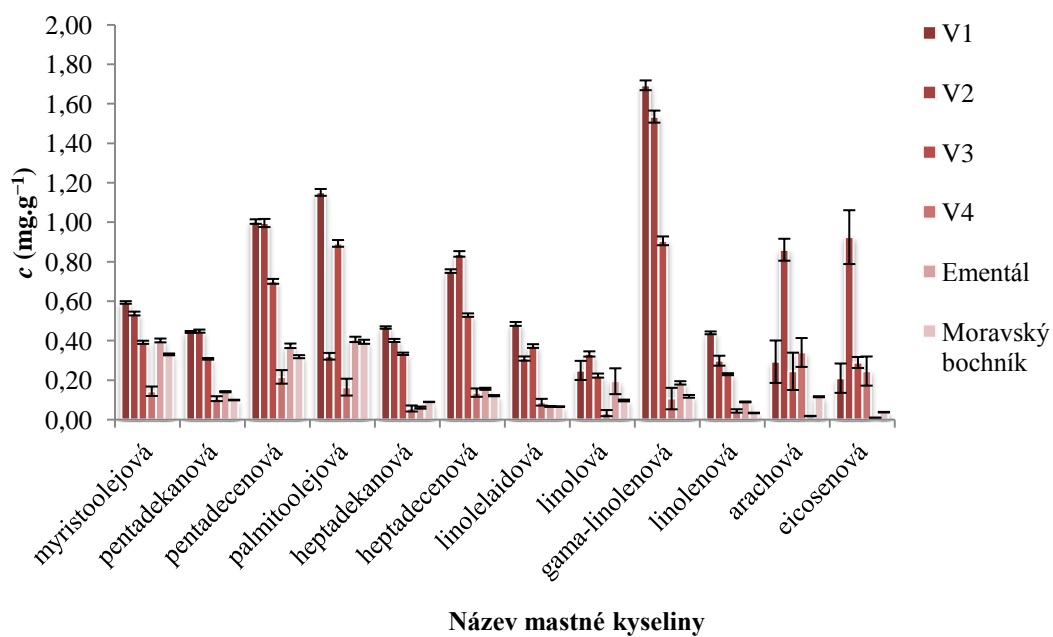
Protože základní složení všech vzorků sýrů je stejné (60 % sušina, 45 % t. v. s.), rozdíly lze patrně přičíst rozdílnému průběhu lipolýzy v průběhu zrání. Jak je patrné z grafu na Obr. 6, nejvyšší obsah vázaných MK byl nalezen ve vzorcích V1 a V2, tj. vyrobených s převahou mezofilní kultury, naopak nejnižší ve vzorku V4, tj. s převahou termofilní kultury. Tento výsledek koresponduje s výsledky stanovení VMK (viz Obr. 10), kde byl u vzorku V4 nalezen naopak nejvyšší obsah z modelových sýrů, což naznačuje rychlejší průběh lipolýzy. Tyto výsledky jsou v souladu s očekáváním, termofilní kultura *Lactobacillus helveticus* vykazuje výraznější lipolytickou aktivitu, než bakterie rodu *Lactococcus* [40].

Ve vzorcích komerčních sýrů byl celkový obsah MK srovnatelný se vzorkem V4, což taktéž svědčí o výraznější lipolýze, která navíc v tomto případě může být podpořena nejspíše použitou propionovou kulturou. V komerčním Ementálu byl nalezen mírně vyšší obsah MK, než v Moravském bochníku, což lze patrně vysvětlit rozdíly v technologickém procesu jejich výroby (vyšší teplota dohřívání, delší doba zpracování a zrání, část zrání při vyšší teplotě 20–26 °C) [10–12].

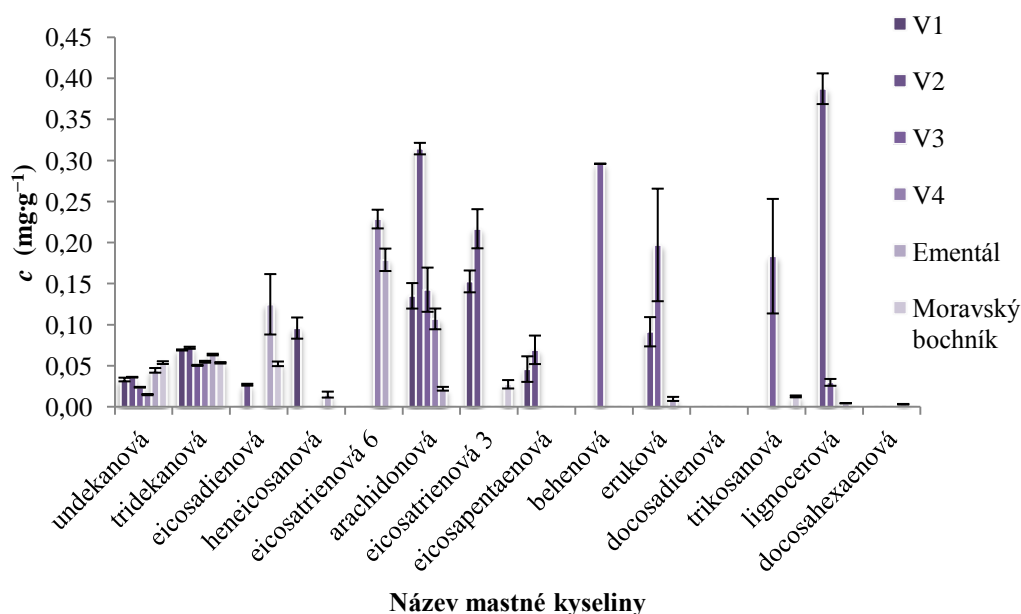
Grafy na Obr. 7 až Obr. 9 zobrazují jednotlivé zastoupení mastných kyselin identifikovaných ve vzorcích sýrů. Vzhledem k rozdílným koncentracím jednotlivých MK jsou pro lepší přehlednost výsledky rozděleny do tří grafů podle jejich kvantitativního zastoupení ve vzorcích.



Obr. 7: Obsah jednotlivých vázaných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra)



Obr. 8: Obsah jednotlivých vázaných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra)



Obr. 9: Obsah jednotlivých vázaných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

Z hlediska zastoupení jednotlivých MK se nejvyšší koncentrace nacházely ve vzorcích V1 a V2 a nejnižší ve vzorku V4. Výsledky většiny MK odpovídají výše zmíněným. Ve všech vzorcích byly z kvantitativního hlediska nejvýznamnější kyseliny palmitová, myristová, stearová a olejová. Naopak nejnižší koncentrace byly nalezeny u kyselin s počtem uhlíků 20 a více. Tyto výsledky jsou v souladu s dosavadními znalostmi o složení mléčného tuku. Kyselina palmitová, myristová a stearová tvoří v tuku kravského mléka nejvyšší procentuální podíl, zatímco kyseliny s vysokým počtem atomů uhlíku se nacházejí ve větším množství v rostlinných a rybích tucích [1].

4.3 Identifikace a kvantifikace volných mastných kyselin ve vzorcích sýrů

Z hlediska senzorických vlastností sýra hrají VMK důležitou roli. Jejich přítomnost nemá jen přímý dopad na chuť sýra, ale jsou především substráty pro redukční reakce dehydrogenáz bakterií produkujících aldehydy, ketony, alkoholy a laktony [8].

Malé množství VMK v sýrech vzniká i při heterofermentativním rozkladu laktózy a degradací aminokyselin. Jejich hlavním zdrojem je však lipolýza. Volné mastné kyseliny vznikají účinkem nativní mléčné lipázy, příp. lipáz mikroorganismů vyskytujících se v mléce. Jedná se především o lipázy startovacích kultur. Mastné kyseliny obsahující více než 6 atomů uhlíku pocházejí výhradně z lipolýzy [19].

Delší řetězce VMK jsou pro chuť sýra nepodstatné, protože je člověk nedokáže vnímat. Krátké a střední řetězce VMK se sudým počtem atomů uhlíků mají mnohem nižší práh vnímání a každá kyselina má charakteristickou chuť/aroma [19]. Například s kyselinou kapronovou souvisí kyselé, sladké či ostré aroma; s kyselinou kaprylovou a kaprinovou voskové až žluklé aroma; naopak víceuhlíkaté kyseliny jako laurová, myristová, palmitová a stearová nenesou žádnou chuť/aroma [8]. Existují studie, dosvědčující že kyseliny linolová a olejová mohou zvýšit vjemy základních chutí v potravinách bohatých

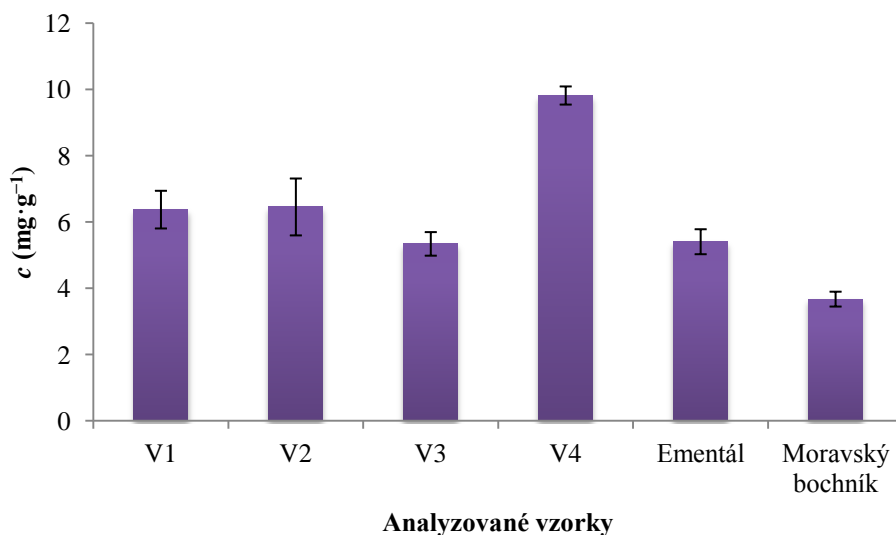
na tuk na základě depolarizace receptorů chuťových buněk [41]. Vliv VMK na charakter sýra je závislý i na jeho pH, při vysokém pH může být účinek VMK zrušen kvůli jejich neutralizaci [19].

Vzhledem ke zmíněné důležitosti VMK v chuti a vůni sýra byl ve vzorcích sledován i obsah VMK. Pro jejich stanovení byla použita jednoduchá metoda esterifikace s bortrifluoridem bez předchozího zmýdelnění hydroxidem sodným (viz kap. 3.3.3). V této kapitole je tedy uveden a porovnán obsah VMK v sýrech. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 6.

Ve všech vzorcích bylo celkem identifikováno 20 VMK.

Ve vzorku V1 byla celkový obsah VMK stanoven na $6,37 \pm 0,57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; ve vzorku V2 $6,45 \pm 0,86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; ve vzorku V3 $5,34 \pm 0,36 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a vzorek V4 obsahoval $9,81 \pm 0,27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ VMK. Obsah VMK u komerčních vzorků byla stanoven pro Ementál na $5,40 \pm 0,38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a pro Moravský bochník na $3,67 \pm 0,22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

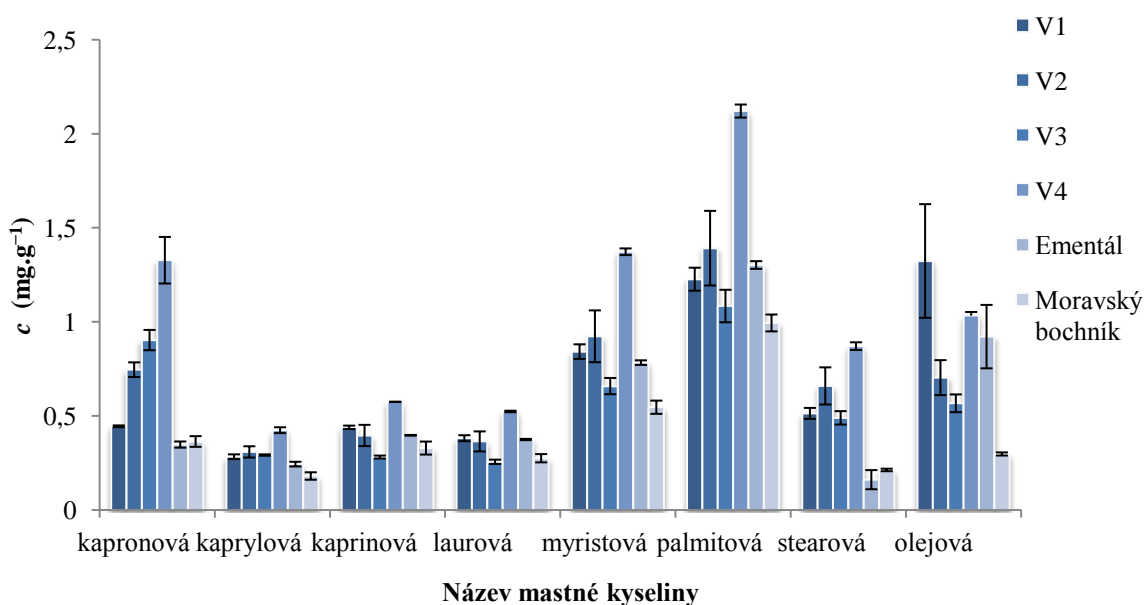
Výsledky prezentované na Obr. 10 ukazují, že celkový obsah VMK je znatelně nejvyšší ve vzorku V4 (převaha termofilní kultury). Vzorky V1 a V2 (převaha mezofilní kultury) mají velmi podobný obsah VMK, který je výrazně nižší než u vzorku V4; nejnižší obsah VMK byl nalezen ve vzorku V3. Jak již bylo zmíněno, termofilní kultura *Lactobacillus helveticus* vykazuje výraznější lipolytickou aktivitu, než mezofilní bakterie [40], díky čemuž je u vzorku V4 zřetelně pokročilejší lipolýza.



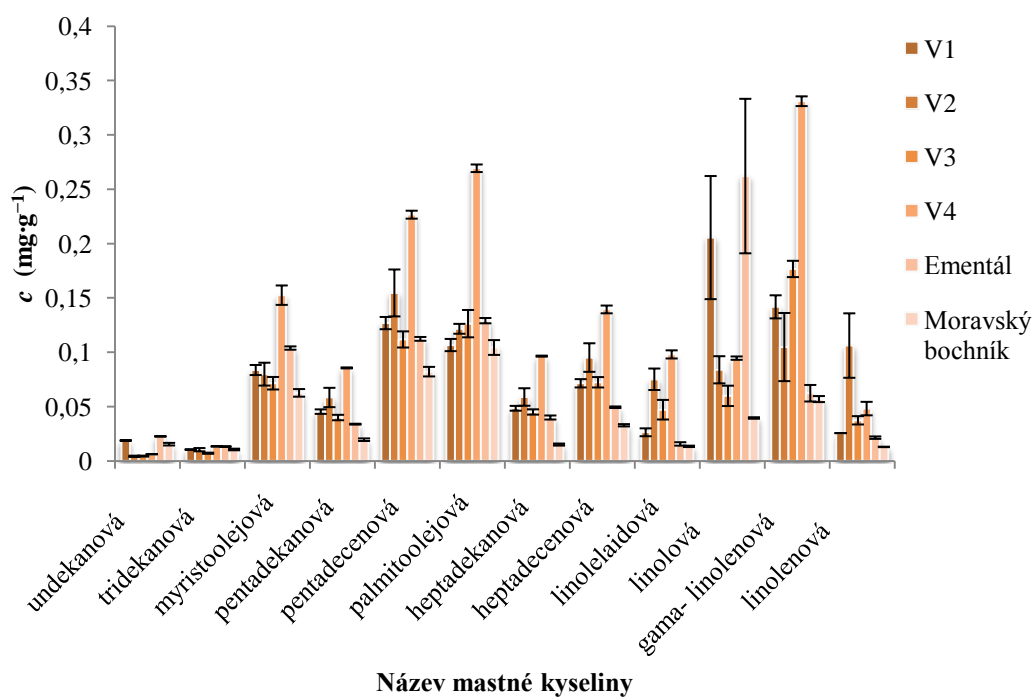
Obr. 10: Celkový obsah volných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

Grafy na Obr. 11 a Obr. 12 zobrazují zastoupení jednotlivých VMK ve vzorcích. Vzhledem k rozdílným koncentracím jednotlivých MK jsou pro lepší přehlednost výsledky opět rozděleny do dvou grafů podle jejich kvantitativního zastoupení ve vzorcích. U většiny VMK je opět zřetelný nejvyšší obsah ve vzorku V4.

Podle našich výsledků by tedy měl být vzorek V4 senzoričticky výraznější, než ostatní vzorky, což bude potvrzeno senzoričtickým hodnocením v následujících experimentech.



Obr. 11: Obsah jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)



Obr. 12: Obsah jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorcích (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

4.4 Srovnání obsahu těkavých, nasycených a nenasycených mastných kyselin ve vzorcích sýrů

V této kapitole je posouzen vliv kombinace kultur na poměr těkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA v sýrech.

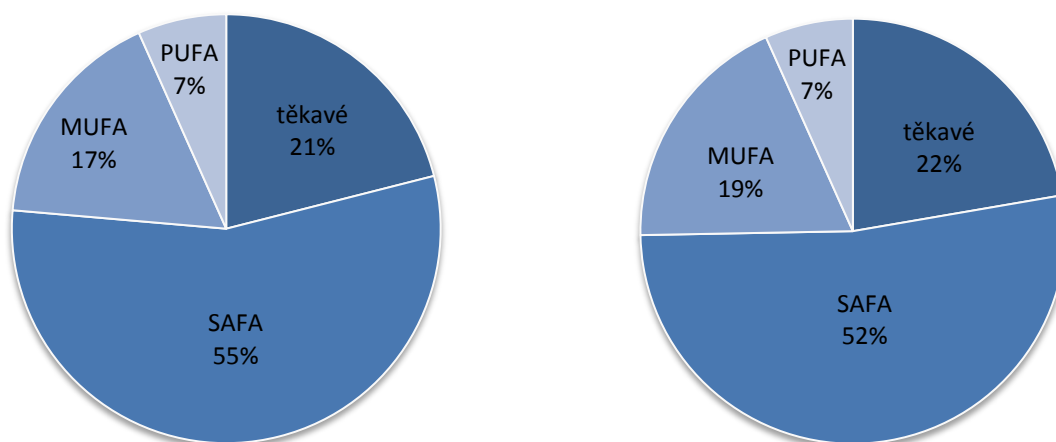
V průběhu výroby sýra se mění skladba MK. Na počátku výroby jsou v mléce nejvíce zastoupeny SAFA, jejichž množství se nepatrně snižuje. Naopak obsah těkavých MK se zvyšuje. Obecně lze říci, že u sýrů švýcarského typu mají největší podíl SAFA, tvořící cca 60 %. Z nenasycených MK v sýru tvoří MUFA zhruba 20 % a PUFA přibližně 3 %, těkavé MK jsou zastoupeny v cca 15 % [42].

Jak je patrné z grafů na Obr. 13 až Obr. 15, poměr těkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA je v souladu s výše zmíněnými poznatky o složení tuku v sýrech švýcarského typu u všech analyzovaných vzorků.

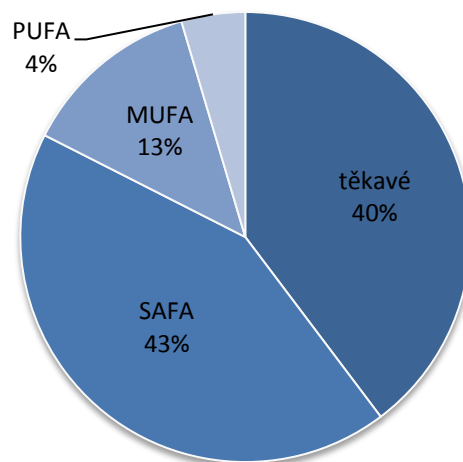
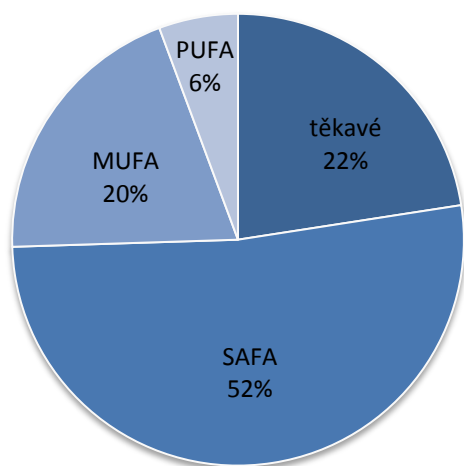
U vzorků V1–V3 je zmíněný poměr velmi podobný, zřetelně se liší složení vzorku V4, u něhož bylo nalezeno výrazně vyšší množství těkavých MK. To může být opět způsobeno převahou použité termofilní kultury, která vykazuje vyšší proteolytickou aktivitu než mezofilní bakterie a v průběhu zrání tak může docházet k vyšší degradaci aminokyselin za tvorby těkavých MK [24].

Složení komerčních vzorků zhruba odpovídá vzorkům V1–V3.

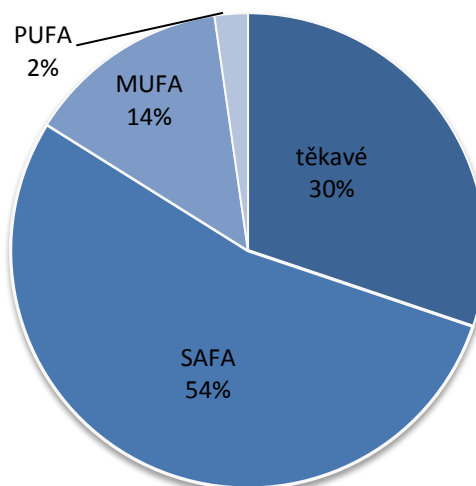
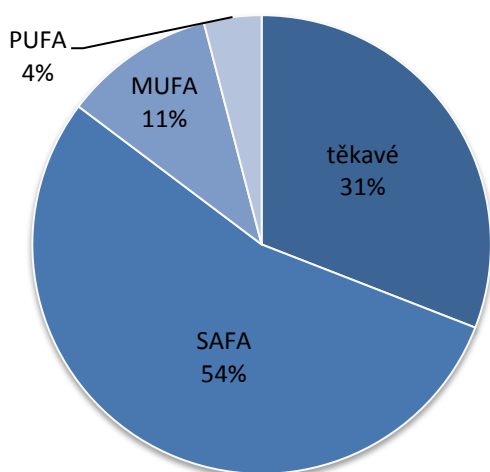
Vzhledem ke skutečnosti, že rozdíl procentuálního zastoupení těkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA v jednotlivých vzorcích je podobný, závisí profil MK spíše na použitém mléce resp. na stravě, genetických dispozicích dojníc a na stádiu jejich laktace. Bylo zjištěno, že krmením dojníc stravou obsahující vyšší podíl nenasycených MK má dopad na zvýšení jejich obsahu jak v mléce, tak i v mléčných produktech. Zvýšený obsah nenasycených MK v mléčných produktech dodává výrobku jemnost, ovšem jejich vysoký obsah způsobuje nevýraznou chuť výrobku [43].



Obr. 13: Zastoupení těkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA ve vzorku V3(vlevo) a V4 (vpravo)



Obr. 14: Zastoupení tĕkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA ve vzorku V3(vlevo) a V4 (vpravo)



Obr. 15: Zastoupení tĕkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA ve vzorku Ementál (vlevo) a Moravský bochník (vpravo)

Tab. 5: Obsah vázaných mastných kyselin identifikovaných ve vzorcích (v mg·g⁻¹ sýra)

	V1	V2	V3	V4	Ementál	Moravský bochník
Kapronová	4,05 ± 0,01	4,18 ± 0,06	3,00 ± 0,12	1,98 ± 0,21	1,15 ± 0,05	1,24 ± 0,05
Kaprylová	2,25 ± 0,01	2,25 ± 0,03	1,66 ± 0,02	1,30 ± 0,05	1,86 ± 0,01	1,44 ± 0,02
Kaprinová	3,78 ± 0,01	3,88 ± 0,04	2,79 ± 0,01	1,97 ± 0,06	3,56 ± 0,01	2,55 ± 0,03
Undekanová	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Laurová	3,02 ± 0,02	2,74 ± 0,04	2,00 ± 0,02	1,11 ± 0,07	2,38 ± 0,02	1,70 ± 0,02
Tridekanová	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Myristová	7,03 ± 0,07	6,25 ± 0,12	4,53 ± 0,07	1,75 ± 0,20	3,56 ± 0,07	2,71 ± 0,05
Myristoolejová	0,59 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Pentadekanová	0,44 ± 0,00	0,45 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Pentadecenová	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Palmitová	10,12 ± 0,12	8,68 ± 0,20	6,18 ± 0,13	1,62 ± 0,33	4,01 ± 0,14	3,69 ± 0,09
Palmitoolejová	1,15 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,89 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Heptadekanová	0,47 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Heptadecenová	0,75 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Stearová	4,93 ± 0,07	4,37 ± 0,10	3,01 ± 0,06	0,61 ± 0,14	1,26 ± 0,04	0,82 ± 0,02
Elaidová	—	—	—	—	—	—
Olejová	4,41 ± 0,25	4,89 ± 0,10	3,56 ± 0,07	0,81 ± 0,16	0,91 ± 0,17	1,20 ± 0,03
Linolelaidová	0,48 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Linolová	0,25 ± 0,05	0,33 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,19 ± 0,07	0,10 ± 0,01
γ-linolenová	1,69 ± 0,02	1,53 ± 0,03	0,91 ± 0,02	0,11 ± 0,05	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Linolenová	0,44 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Arachová	0,29 ± 0,11	0,86 ± 0,06	0,24 ± 0,09	0,34 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Eicosenová	0,21 ± 0,07	0,92 ± 0,14	0,29 ± 0,03	0,25 ± 0,07	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Tab. 5 pokračování: Obsah vázaných mastných kyselin identifikovaných ve vzorcích (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra)

	V1	V2	V3	V4	Ementál	Moravský bochník
Eicosadienová	—	$0,03 \pm 0,01$	—	—	$0,13 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,01$
Heneicosanová	$0,10 \pm 0,01$	—	—	—	$0,02 \pm 0,01$	—
Eicosatrienová 6	—	—	—	$0,23 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	—
Arachidonová	$0,14 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	—
Eicosatrienová 3	$0,15 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	—	—	—	$0,03 \pm 0,01$
Eicosapentaenová	$0,05 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$	—	—	—	—
Behenová	—	—	$0,30 \pm 0,01$	—	—	—
Eruková	—	$0,09 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,07$	—	$0,01 \pm 0,01$	—
Docosadienová	—	—	—	—	—	—
Trikosanová	—	—	$0,18 \pm 0,07$	—	—	$0,01 \pm 0,01$
Lignocerová	—	$0,39 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	—	—	—
Docosahexaenová	—	—	—	—	—	—
Nervonová	—	—	—	—	—	—

Tab. 6: Obsah volných mastných kyselin identifikovaných ve vzorcích (v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra)

	V1	V2	V3	V4	Ementál	Moravský bochník
Kapronová	$0,45 \pm 0,00$	$0,75 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,12$	$0,35 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,03$
Kaprylová	$0,28 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,00$	$0,42 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$
Kaprinová	$0,44 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,00$	$0,33 \pm 0,03$
Undekanová	$0,02 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
Laurová	$0,38 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,00$	$0,28 \pm 0,02$

Tab. 6 pokračování: Obsah volných mastných kyselin identifikovaných ve vzorcích (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

	V1	V2	V3	V4	Ementál	Moravský bochník
Tridekanová	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Myristová	0,84 ± 0,04	0,92 ± 0,14	0,66 ± 0,04	1,37 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,55 ± 0,04
Myristoolejová	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Pentadekanová	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Pentadecenová	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Palmitová	1,23 ± 0,06	1,39 ± 0,20	1,08 ± 0,09	2,12 ± 0,03	1,30 ± 0,02	0,99 ± 0,04
Palmitoolejová	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Heptadekanová	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Heptadecenová	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Stearová	0,51 ± 0,03	0,66 ± 0,10	0,49 ± 0,04	0,87 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,21 ± 0,01
Olejová	1,32 ± 0,30	0,70 ± 0,09	0,57 ± 0,05	1,03 ± 0,02	0,92 ± 0,17	0,30 ± 0,01
Linolelaidová	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Linolová	0,21 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,26 ± 0,07	0,04 ± 0,00
γ- linolenová	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,33 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Linolenová	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce je posouzení vlivu mikrobiálních kultur v různých poměrech na obsah volných a vázaných MK v modelových vzorcích sýrů typu Moravský bochník. Pro doplnění byly analyzovány i komerční vzorky obdobných typů sýrů z běžné tržní sítě, tj. Moravský bochník a Ementál.

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Tvoří základní složku lipidů. Mohou se vyskytovat ve formě VMK, nebo vázaných MK. Pro izolaci lipidů ze vzorku byla použita extrakce směsí rozpouštědel (diethylether a petrolether) podle ČSN EN ISO 1735:2005. Mastné kyseliny byly následně převedeny na methylestery pomocí kyselé esterifikace methanolicným roztokem bortrifluoridu. K jejich stanovení byla použita plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí.

V modelových a komerčních vzorcích bylo identifikováno celkem 32 vázaných MK a 20 VMK.

Modelové vzorky sýra byly vyrobeny na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně standardním technologickým postupem. Při jejich výrobě byla použita mezofilní kultura *Flora Danica* (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc* spp.) a termofilní kultury *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*, resp. jejich různé kombinace s převažující mezofilní nebo termofilní kulturou.

Nejvyšší koncentrace vázaných MK a nejnižší koncentrace VMK mají vzorky V1–V3 s převažující mezofilní kulturou. Naopak nejnižší koncentrace vázaných MK a nejvyšší koncentrace VMK byly stanoveny ve vzorku V4 s převládající termofilní kulturou *Lactobacillus helveticus*. Jelikož složení všech vzorků sýra je stejné (60 % sušina, 45 % t. v s.), rozdíly v obsahu vázaných MK a VMK vedou k závěru, že zvýšená koncentrace VMK je úměrná vyššímu množství termofilní kultury *Lactobacillus helveticus*. Tato bakterie má v porovnání s použitou mezofilní kulturou zvýšenou lipolytickou aktivitu, tzn. je schopna uvolňovat VMK z lipidů. Lze předpokládat, že vzorek V4 bude z důvodu vyššího obsahu VMK senzoričky výraznější. Tato úvaha bude potvrzena senzoričným hodnocením v následujících experimentech.

U komerčních vzorků (Ementál a Moravský bochník) byly koncentrace vázaných MK a VMK srovnatelné se vzorky s dominující mezofilní kulturou. Ve vzorku Ementál byla koncentrace vázaných MK i VMK vyšší, než ve vzorku Moravský bochník. Důvodem jsou pravděpodobně rozdíly v technologickém procesu výroby. Komerčně vyráběné Moravské bochníky mají poměrně málo výraznou chuť a jsou určeny především pro výrobu tavených sýrů.

Výrazná odlišnost vzorku V4 (převažující obsah termofilní bakterie *Lactobacillus helveticus*) se projevila i při srovnání obsahu těkavých MK, SAFA, MUFA a PUFA. Zatímco procentuální zastoupení MK ve všech ostatních modelových i komerčních vzorcích je obdobné, vzorek V4 má vyšší zastoupení těkavých MK. To může být

způsobeno proteolytickou aktivitou použité termofilní kultury, která způsobuje tvorbu těkavých MK následkem degradace aminokyselin.

Tato práce představuje první orientační výsledky v dané problematice; budou navazovat další experimenty zkoumající podrobněji dosažené poznatky, především pak bude zkoumán vliv VMK na senzorickou kvalitu sýrů.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902-3914-5.
- 2 MURRAY, Robert K et al. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.). Jinočany: H+H, ©2002, 872 s. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- 3 KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2. přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005, 144 s. ISBN 80-863-6911-0.
- 4 DOSTÁL, Jiří. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 158 s. ISBN 978-80-210-5020-4.
- 5 PAUL, Catherine. Triglyceride structure. In: *Study.com* [online]. Study, ©2003-2017 [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://study.com/cimages/multimages/16/triglycerides2.jpg>
- 6 ZEHNÁLEK, Josef. *Biochemie* 2. 2. nezměn. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2009, 200 s. ISBN 978-80-7375-327-6.
- 7 VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, ©1996, 508 s. ISBN 978-80-200-0600-4.
- 8 WEIMER, Bart, ed. *Improving the Flavour of Cheese: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. Cambridge: Publishing Woodhead, 2007, 600 pp. ISBN 978-0-8493-9158-3.
- 9 Složení sýrů. *Cheesy Kladno* [online]. Kladno: Cheesy Kladno, ©2011 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: www.cheesykladno.cz/syrove-pojmy/slozeni-syru/
- 10 DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií: spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996, 512 s. ISBN 80-967-0641-1.
- 11 GAJDUŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998, 135 s. ISBN 80-715-7342-6.
- 12 PAVELKA, Antonín. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Brno: Litera, 1996, 105 s. ISBN 80-857-6309-5.
- 13 KADLEC, Pavel, MELZUCH, Karel a VOLDŘICH, Michal. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- 14 KOPÁČEK, Jiří. Zapomenuté sýry. In: *Lactos Collection* [online]. Praha: Laktos Praha, 2009 [cit. 2016-11-15]. Dostupné z: <http://laktoscollection.cz/view.php?nazev=zapomenute-syry&cislocianku=2009080009>

- 15 BUŇKA, František. *Mlékárenská technologie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.
- 16 FOX, Patrick F., GUINEE, Timothy P and COGAN, Timothy M. *Fundamentals of cheese science*. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Pub., 2000, 799 pp. ISBN 978-0-8342-1260-2.
- 17 IBURG, Anne. *Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť*. Čestlice: Rebo Productions CZ, 2004, 301 s. ISBN 80-723-4379-3.
- 18 FOX, Patrick F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004, 617 pp. ISBN 01-226-3652-X.
- 19 COLLINS, Yvonne F., MCSWEENEY, Paul L.H. and WILKINSON, Martin G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* [online]. Elsevier, 2003, **13**(11), 841-866 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694603001092>
- 20 LOPEZ, Christelle, BRIARD-BION, Valerie, BEAUCHER Eric and OLLIVON, Michel. Multiscale Characterization of the Organization of Triglycerides and Phospholipids in Emmental Cheese: From the Microscopic to the Molecular Level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, **56**(7), 2406-2414 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1021/jf0720382. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0720382>
- 21 CASTADA, Hardy, PARK, Clifford, HARPER, James W. and BARRINGER, Sheryl. Suppression of propanoic acid, acetic acid and 3-methylbutanoic acid production by other volatiles in a Swiss cheese curd slurry system. *International Dairy Journal* [online]. Elsevier, 2016, **54**, 29–32 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.10.007. ISSN 0958-6946. Dostupné z: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694615002034
- 22 BERESFORD, Tom P, FITZSIMONS, Nora, BRENNAN, Noelle L., and COGAN, Tim M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* [online]. Elsevier, 2001, **11**(4-7), 259-274 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00056-5. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000565>
- 23 SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- 24 FOX, Patrick F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004, 434 pp. ISBN 01-226-3653-8.
- 25 ADAMS, M. R. a MOSS, M. O. *Food microbiology*. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 479 pp. ISBN 08-540-4611-9.

- 26 GÖRNER, Fridrich a VALÍK, Lubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- 27 CRUZ-HERNANDEZ, Cristina a DESTAILLATS, Frédéric. Gas Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters: Derivatization. *Encyclopedia of Lipidomics* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1007/978-94-007-7864-1_66-1. ISBN 978-94-007-7864-1. Dostupné z: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-94-007-7864-1_66-1
- 28 FIFIELD, F. W. and KEALEY, D. *Principles and practice of analytical chemistry*. 4th ed. New York: Blackie Academic, 1995, 560 pp. ISBN 07-514-0226-5.
- 29 SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- 30 HARRIS, Daniel C. *Exploring chemical analysis*. New York: W.H. Freeman, ©1997, 476 pp. ISBN 07-167-3042-1.
- 31 SMOLKOVÁ, Eva, FELTL, Ladislav a PACÁKOVÁ, Věra. *Plynová chromatografie I.: Teoretické základy*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1975, 109 s.
- 32 KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- 33 CLEMENT, R. E. *Gas chromatography: biochemical, biomedical, and clinical applications*. New York: Wiley, ©1990, 393 pp. ISBN 04-710-1048-0.
- 34 ROUESSAC, Francis and ROUESSAC, Annick. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007, 574 pp. ISBN 978-0-470-85903-2.
- 35 SKOOG, Douglas A. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, ©1992, 700 pp. ISBN 00-307-5398-8.
- 36 SMOLKOVÁ, Eva, FELTL, Ladislav a PACÁKOVÁ, Věra. *Plynová chromatografie II.: Instrumentální část*. 1. Praha: Univerzita Karlova, 1983, 109 s.
- 37 ČSN EN ISO 1735:2005 *Sýry a sýrové výrobky – Stanovení obsahu tuku – Gravimetrická metoda (Referenční metoda)*.
- 38 AKOH, Casimir C. and MIN, David B. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor, ©2008, 928 pp. ISBN 978-142-0046-632.

- 39 SÝKORA, Michal. Optimalizace a validace metody stanovení volných mastných kyselin. Brno, 2016, 68 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Vedoucí práce Eva Vítová.
- 40 SLATTERY, L. et al. Invited review: *Lactobacillus helveticus*—A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science* [online]. Elsevier, 2010, **93**(10), 4435-4454 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.3168/jds.2010-3327. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210004753>
- 41 MCCORMACK, Danielle N., CLYBURN, Virginia L. and PITTMAN, David W. Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *Physiology and Behavior* [online]. Elsevier, 2006, **87**(3), 582-594 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.physbeh.2005.12.004. ISSN 00319384. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938405005512>
- 42 DOMAGAŁA, Jacek, PLUTA-KUBICA, Agnieszka and PUSTKOWIAK, Henryk. Changes in Conjugated Linoleic Acid Content in Emmental-Type Cheese during Manufacturing. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2013, **31**(5), 432-437 [cit. 2017-03-12]. ISSN 1212-1800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/104978.pdf>
- 43 CHEN, She et al. Physical and Sensory Properties of Dairy Products from Cows with Various Milk Fatty Acid Compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(11), 3422-3428 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1021/jf035193z. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035193z>

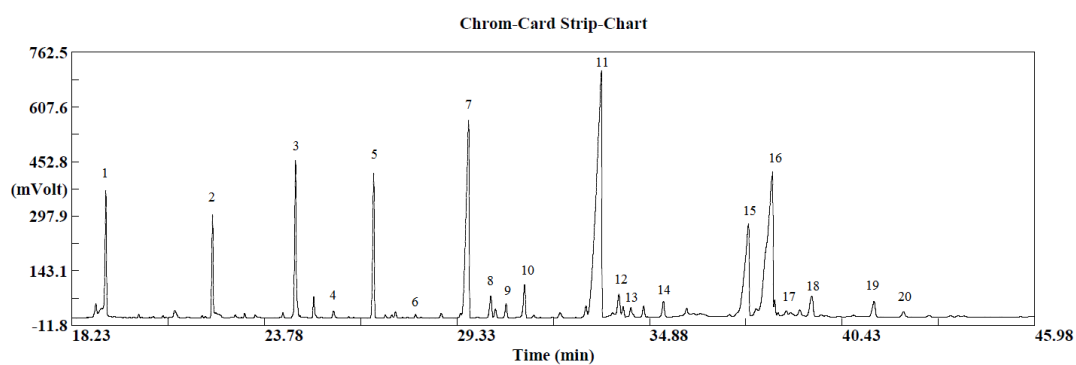
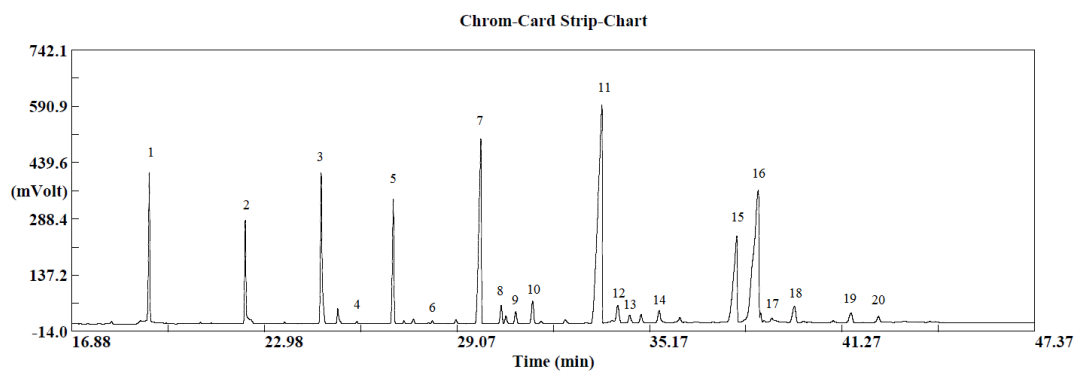
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ECD	detektor elektronového záchytu
FID	plamenový ionizační detektor
FPD	plamenový fotometrický detektor
GC	plynová chromatografie
GC-FID	plynová chromatografie s plameno-ionizačním detektorem
MEMK	methylestery mastných kyselin
ME	methylestery
MK	mastné kyseliny
MUFA	mono-nenasycené mastné kyseliny
PID	foto-ionizační detektor
PLOT	kolony s vrstvou pevného sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry
PUFA	poly-nenasycené mastné kyseliny
SAFA	nasycené mastné kyseliny
SCOT	kolony s nosičem pro zakotvení kapalně stacionární fáze
TAG	triacylglycerol/y
TCD	tepelně vodivostní detektor
TID	termoionizační detektor
VMK	volné mastné kyseliny
WCOT	kolony s kapalnou stacionární fází

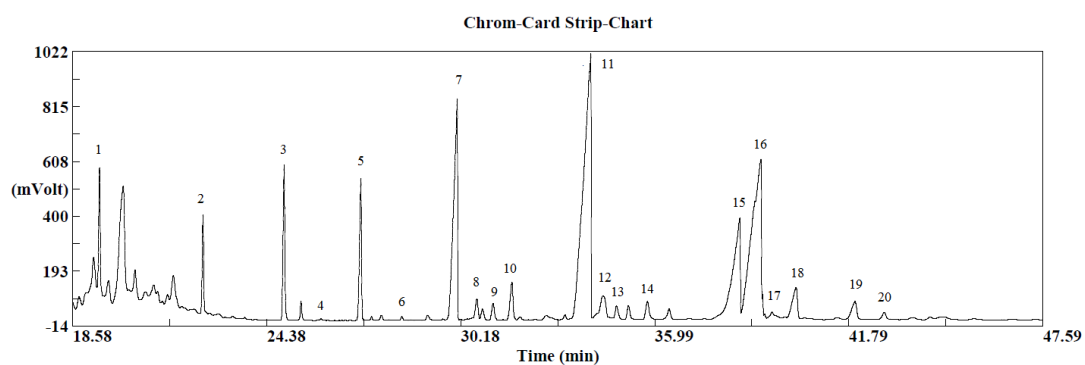
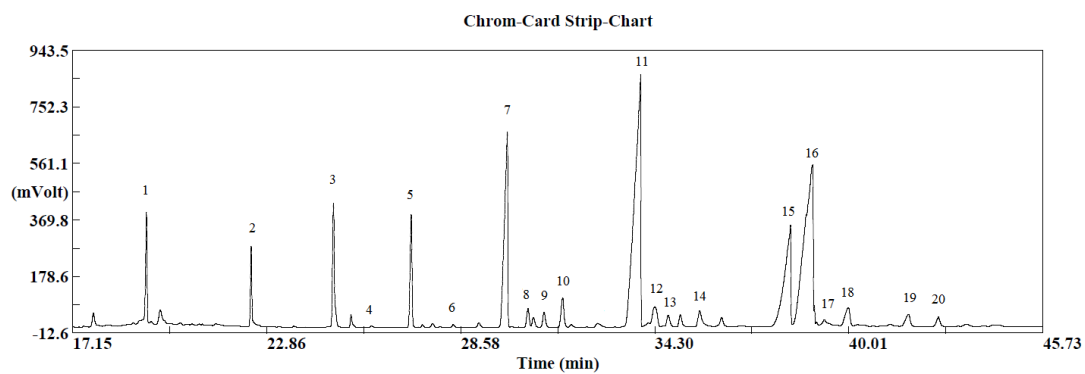
8 SEZNAM PŘÍLOH

- | | |
|-----------|---|
| Příloha 1 | Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V1 |
| Příloha 2 | Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V2 |
| Příloha 3 | Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V3 |
| Příloha 4 | Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V4 |
| Příloha 5 | Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Ementál |
| Příloha 6 | Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Moravský bochník |
| Příloha 7 | Legenda k chromatogramům |

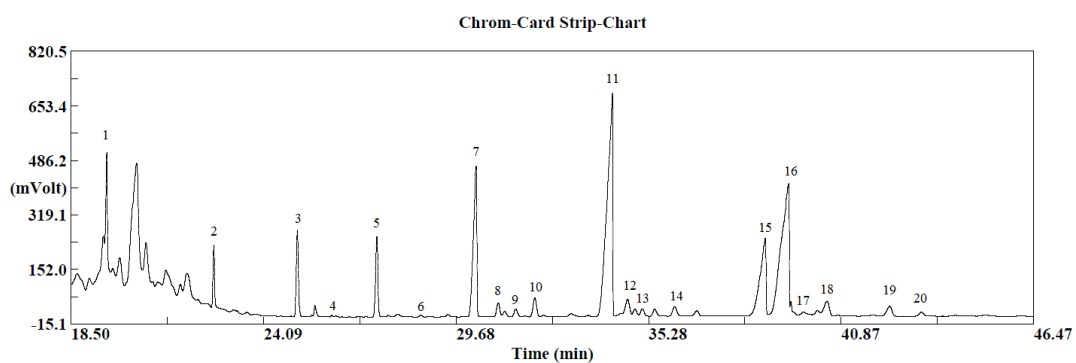
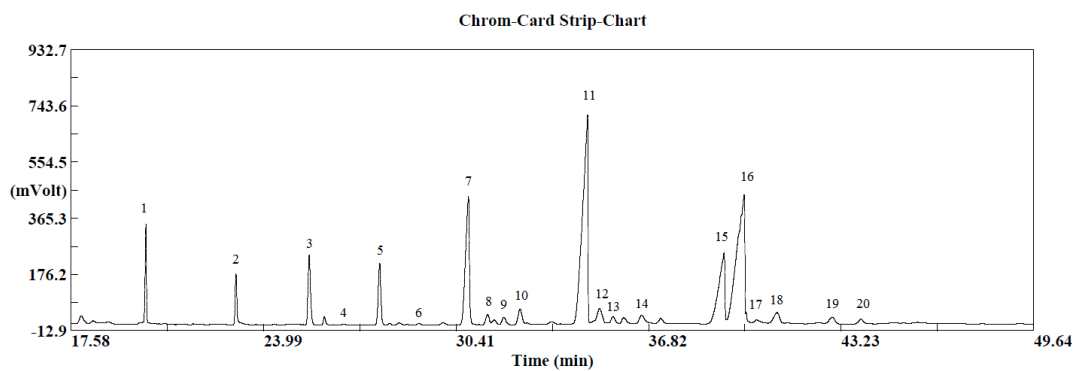
9 PŘÍLOHY



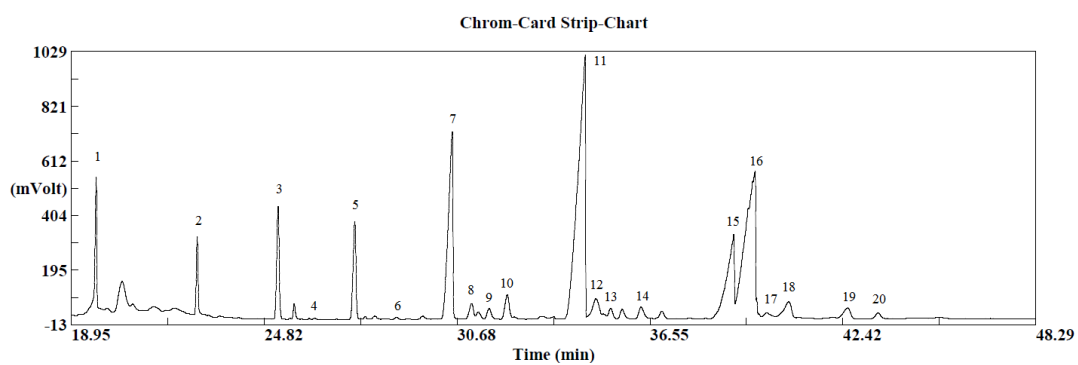
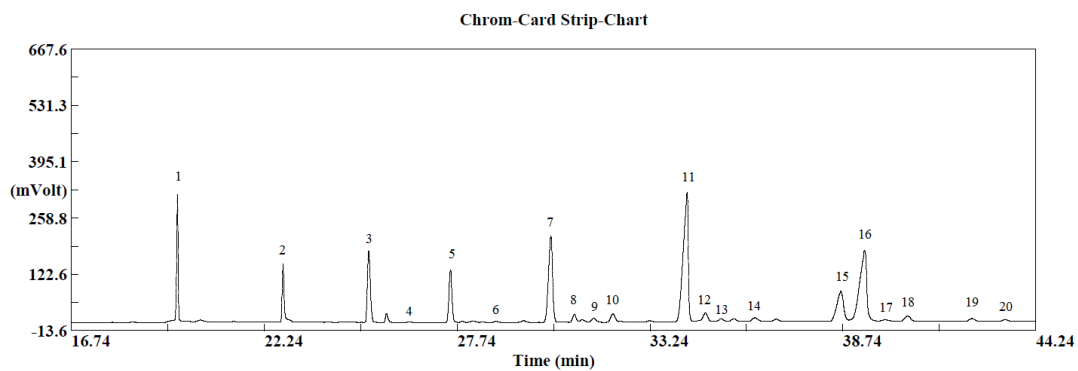
Příloha 1: Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku VI



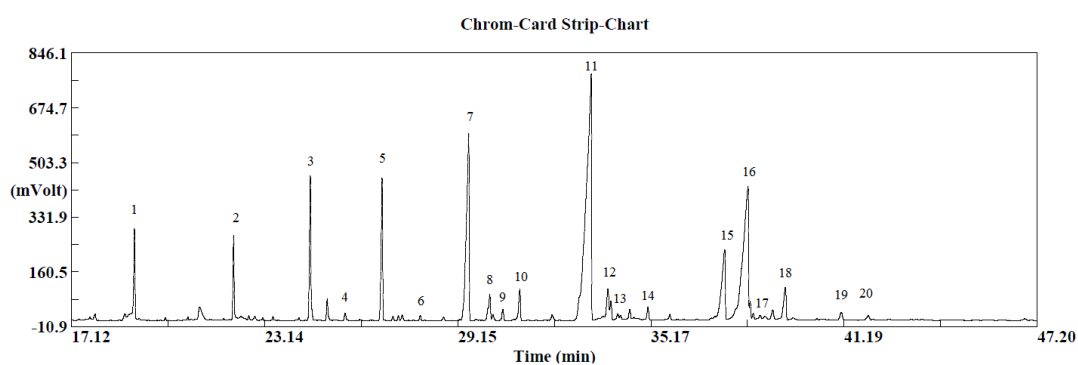
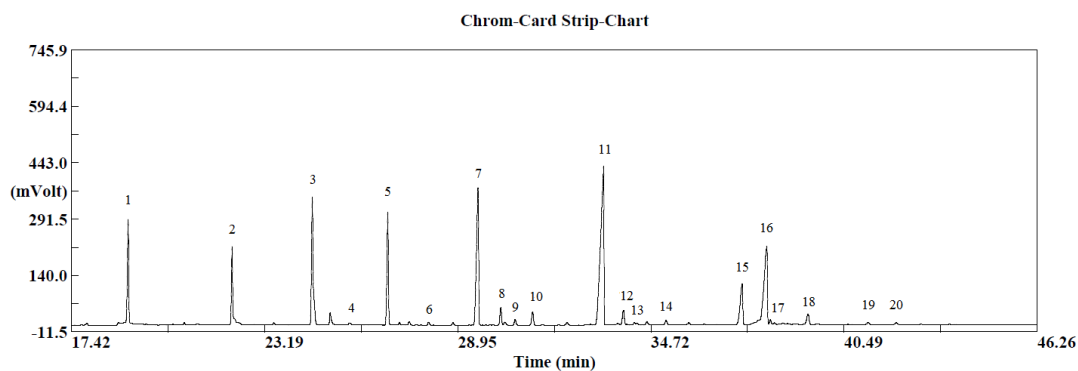
Příloha 2: Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V2



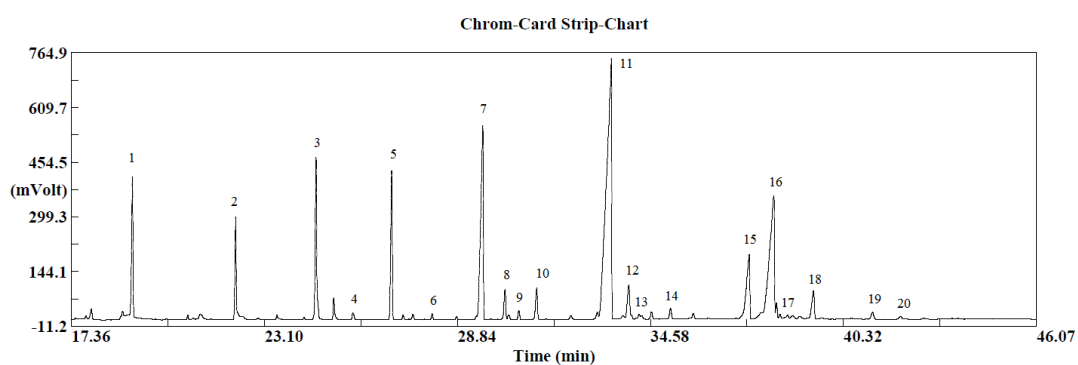
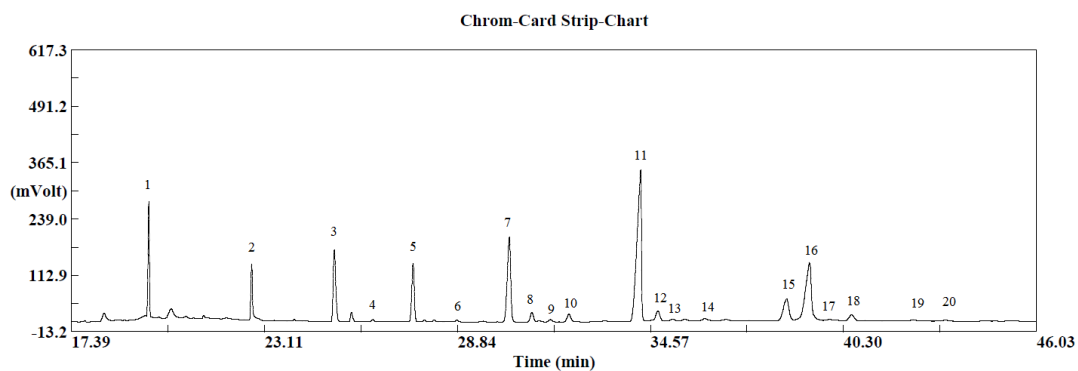
Příloha 3: Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V3



Příloha 4: Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku V4



Příloha 5: Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Ementál



Příloha 6: Ukázka chromatogramu mastných kyselin (vzorek ředěný 10×) (nahore) a volných mastných kyselin (dole) ve vzorku Moravský bochník

Příloha 7: Legenda k chromatogramům

Název mastné kyseliny	Číslo píku	Název mastné kyseliny	Číslo píku
Kapronová	1	Palmitová	11
Kaprylová	2	Palmitoolejová	12
Kaprinová	3	Heptadekanová	13
Undekanová	4	Heptadecenová	14
Laurová	5	Stearová	15
Tridekanová	6	Olejová	16
Myristová	7	Linolelaidová	17
Myristoolejová	8	Linolová	18
Pentadekanová	9	γ -linolenová	19
Pentadecenová	10	Linolenová	20